



## BEST AVAILABLE COPY

Patent  
Customer No. 22,852  
Attorney Docket No. 04853.0086

### IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
)  
OGATA et al. ) Group Art Unit: 1646  
)  
Application No.: 10/019,571 ) Examiner: Ruixiang Li  
)  
§ 371 Date: December 31, 2001 )  
)  
PCT Filing Date: July 3, 2000 )  
)  
For: THERAPEUTIC AGENT FOR )  
DISEASES CAUSED BY PTH OR )  
PTHrP )

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

#### **Declaration Pursuant to In Re Hawkins, 179 U.S.P.Q. 157 (C.C.P.A. 1973)**

I, Rebecca M. McNeill, do hereby declare and say that:

1. The specification at page 7, second paragraph is amended to recite that "[i]n the present specification, the term 'a PTH receptor or PTHrP receptor' is used to mean a receptor binding to PTH or PTHrP, and examples include a PTH/PTHrP type I receptor (described in Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598; SEQ ID NO: 76)."

The amendatory material is shown with underlining.

2. This amendatory material (SEQ ID NO. 76) is quoted from the reference cited in the same paragraph. See Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598, Figure 6; See *also* WO 92/17602, the English-language equivalent, Figure 6 and description of the drawings at page 8, third paragraph. This Japanese patent application is incorporated by reference on page 84, lines 5-6 of the specification.

3. Thus, no new matter is introduced by way of this amendment.

4. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true; that all statements made on information and belief are believed to be true; that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code; and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Dated: November 18, 2004

By: Rebecca M. McNeill  
Rebecca M. McNeill  
Reg. No. 43,796

## BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506598

第1部第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)7月28日

(51) Int. Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/12	Z N A		
A 6 1 K 37/02	A D D	8314-4C	
	A E G		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00
		8412-4B	5/ 00
			A
			B
			(全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-510035  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)4月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月5日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US92/02821  
 (87) 国際公開番号 WO92/17602  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)10月15日  
 (31) 優先権主張番号 681,702  
 (32) 優先日 1991年4月5日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP

(71) 出願人 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツストリート 55  
 (72) 発明者 セグレ ギノ ブイ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウエイランド セジメドウロード58  
 (72) 発明者 クロネンベルグ ヘンリー エム  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント ヘイスティングスロード 48  
 (74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

(57) 【要約】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA、組換え及び合成副甲状腺ホルモンレセプターポリペプチド及びその断片、副甲状腺ホルモンレセプター及びレセプター断片に対する抗体、候補化合物を副甲状腺ホルモンレセプターの作用に対するアンタゴニストあるいはアゴニスト効果についてスクリーニングする方法、及びこれらの化合物の利用による診断と治療法が開示される。

### 請求の範囲

1. 特長発達の抑制レセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAであって、同定レセプターが、図3に示されているアミノ酸配列に少なくとも30%の同一性を持つアミノ酸配列を持つことを特徴とする方法。

2. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNA配列が図1に示されているアミノ酸配列（SEQ ID NO. 1）の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

3. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているアミノ酸配列（SEQ ID NO. 3）の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

4. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記分離されたDNAが（EAG）であって、ATCCに蓄積され、ATCC登録番号6570とされていることを特徴とする方法。

5. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図6に示されているアミノ酸配列（SEQ ID NO. 4）の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

6. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図1に示されているDNA配列（SEQ ID NO. 1）とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

7. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているDNA配列（SEQ ID NO. 3）とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

16. 請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、前記部分が前記甲状腺ホルモンレセプター遺伝子のすべてより短いことを特徴とする方法。

17. 請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、上記DNAが検出されて検出可能であることを特徴とする方法。

18. 甲状腺ホルモンレセプターcDNAの1部からなる1本鎖DNAであって、上記部分の少なくとも18ヌクレオチドの長さであることを特徴とする方法。

19. 請求項18に記載されている1本鎖DNAであって、前記DNAがアンチセンスであることを特徴とする方法。

20. 甲状腺ホルモンレセプターをコードしている複製DNA分子の発現によって生成される甲状腺ホルモンレセプターを特徴とする方法。

21. 請求項20に記載されている甲状腺ホルモンレセプターの本質的に複製された断片を特徴とする方法。

22. 請求項21に記載されているDNAの発現によって、生成される甲状腺ホルモンレセプターの本質的に複製された断片を特徴とする方法。

23. 少なくとも1つのアミノ酸、そして甲状腺ホルモンレセプターの完全なアミノ酸配列より少ないアミノ酸からなるポリペプチドであって、上記ポリペプチドが甲状腺ホルモンあるいは甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来ることを特徴とする方法。

24. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記甲状腺ホルモンレセプターがヒト甲状腺レセプターであることを特徴とする方法。

### 特許平6-506598 (2)

8. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図6に示されているDNA配列（SEQ ID NO. 4）とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

9. ベクターの複製体であって、前記ベクターが甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。

10. 請求項1に記載されている分離されているDNAを含む細胞であることを特徴とする方法。

11. 請求項10に記載されている細胞であって、前記細胞が前記の分離されているDNAから上記甲状腺レセプターを発現する能力のあることを特徴とする方法。

12. 本質的に均質な細胞群であって、そのうちの請求項1に記載されている分離されたDNAを含むことを特徴とする方法。

13. 分離されたDNAが、甲状腺ホルモンあるいは甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することの出来るポリペプチドをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。

14. ポリペプチドを生成する方法で、前記方法が以下のことからなることを特徴とする：

甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を培養する方法、及び

前記DNAからポリペプチドの発現を可能にする条件下に前記細胞を培養する方法。

15. 甲状腺ホルモンレセプター遺伝子の1部からなる1本鎖DNAであって、前記部分の少なくとも18塩基の長さであることを特徴とする方法。

25. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記断片が以下のものからなることを特徴とする方法。

(A) TWETREREVFDRLGMITYVG、

(B) YLYSGFTLDEAEELTESEL、

(C) VTFFLYFLATNYWYLVSG、

(D) Y-RLATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP、

(E) PYTEYSGTLWQIQMHYEM、

(F) DDVFTEDEQIFLLHRAQA、

(G) FPRLECTRNY、

(H) EKKYLWQPTL、

(I) VLATKIRETNACRCGTRQYRKLK、あるいは

(J) 甲状腺ホルモンあるいは甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来る

(A) から (I) の断片。

26. 複製上誘発される断片中に、(a) 甲状腺ホルモンレセプターあるいは (b) 上記レセプターの断片からなるポリペプチドを含む複製産物を特徴とする方法。

27. 甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成することが出来る断片を特徴とする方法。

28. 請求項27に記載されている断片と複製上誘発される断片からなる治療剤を特徴とする方法。

29. 動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項26に記載されている治療剤を、上記動物に、甲状腺ホルモンあるいは甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

# 請求項6-506598 (9)

30. 動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項28に記載されている治療化合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の改善に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

31. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を調製する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 請求項23に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモンと、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

32. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を調製する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 請求項23に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることを示唆する。

37. 副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしているDNA配列からなるトランス遺伝子を持つ形質転換されたヒト以外の脊椎動物を特徴とする方法。

38. 以下の内容からなる診断法を特徴とする方法：

- (a) 動物から1回目の血液試料を取り；
- (b) 請求項33に記載されている化合物を上記動物に投与し；
- (c) 上記化合物の投与後、上記動物から2回目の血液試料を取り；
- (d) 上記1回目の血液試料中のカルシウムレベルを上記2回目の血液試料中のものと比較し、上記2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方が低い場合は、副甲状腺ホルモン関連の状態の診断に役立つ。

39. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、上記DNAの配列が副甲状腺ホルモンレセプターをコードしていることを特徴とする方法。

40. 請求項24に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

41. 請求項23に記載されているポリペプチドを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

42. 請求項27に記載されている抗体を治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

43. 請求項26に記載されている治療化合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

43. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を調製する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 副甲状腺ホルモンと請求項23に記載されている細胞と、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

34. 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質の細胞膜上の副甲状腺レセプターへの結合を阻害する能力のある化合物を特徴とする方法。

35. 請求項34に記載されている化合物と製剤とを投与される動物からなる治療化合物を特徴とする方法。

36. 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相応するDNA配列を低減する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- ゲノムあるいはcDNAライブラリーをスクリーニング；
- 上記ライブラリーを請求項14に記載されている1本鎖DNAと、上記1本鎖DNA及び上記ライブラリー中の相同DNA配列間にハイブリッド形成可能なような条件下に接触させ、及び
- 上記ライブラリーから、上記1本鎖DNAとハイブリッド形成しているクローンを割り出し増殖する。そして、ハイブリッド形成は、上記クローンの中に、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相応するDNA配列の存在することを示唆する。

44. 請求項28に記載されている治療化合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

45. 請求項20に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

46. 請求項23に記載されているポリペプチドを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

47. 請求項27に記載されている抗体を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

48. 患者における副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質によって媒介される高カルシウム血症状態を低減する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする方法：

- (a) 患者からの1回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、
- (b) 請求項28に記載されている治療化合物の投与後のある時期に患者から採取された2回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、
- (c) 2つの血液試料のカルシウムレベルを比較して、2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方がより低い場合は、患者に副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質に拮抗する状態のあることを示唆する。



特表平6-506598 (5)

(a) TNETRESEVFDRLCMIYTVG: (SEQ ID NO. : 5)  
 (b) YLYSGFTLEEARLTZEEL: (SEQ ID NO. : 6)  
 (c) VTFFLYFLATNYVWILEVG: (SEQ ID NO. : 7)  
 (d) Y-RATLANTCGWDLSSCHKKW)IQVP: (SEQ ID NO. : 8)  
 (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM: (SEQ ID NO. : 9)  
 (f) DDVFTKZEQIFLLHRAQA: (SEQ ID NO. : 10)

(g) FFRHLCTRNY: (SEQ ID NO. : 11)  
 (h) EKKYLWGFLL: (SEQ ID NO. : 12)  
 (i) VLATKLRETNAGRCDTROQYKLLK: (SEQ ID NO. : 13) あるいは

(j) 断片 (即ち、少なくとも6個の塩基を持つが、全体よりは短い部分) あるいは (k) - (i) の配列体 (アナログ) で、副甲状腺ホルモン、あるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質 (ここで「類似体 (アナログ: analog)」とは、それが類似体であるペプチドと少なくとも0% (そして望ましいのは少なくとも70%) 程度の配列を持つペプチドを造る) を結合する能力を持つもの。出来れば、本発明のペプチドは細胞内DNA分子の範囲によって生成されるか、または合成品 (即ち、生物学的よりも化学的な手段によって組み立てられた) であることが望ましい。本発明はこのようなペプチドを生成する方法を提供し、この方法には、本発明の細胞レセプター、あるいはレセプターの断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供すること、及びこの細胞を、分離されたDNAからペプチドの発現を可能にするような条件下で培養することが含まれる。

本発明は、また、この発明の細胞レセプター (出来ればヒトのPTHレセプターのような副甲状腺ホルモンレセプター) と免疫複合体を形成する能力のある抗

体 (モノクローナルまたは多クローナル) 及び試体の付着製品を特徴とする。このような試体は、従来として (1) 本発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチド、あるいは (2) 細胞膜上に存在する本発明の細胞レセプターを印するることによって生成される。この試体は、出来れば、本発明の細胞レセプターの塩基 (即ち、レセプターにそのリガンドが結合する時、レセプターによって本発明の起こされるカスケード反応の一部を形成するもの) を中和 (即ち、部分的に、または完全に阻害する) する能力を持つことが望ましい。前述の免疫複合体において、本発明の試体は副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成する能力を持ち、PTHレセプターの免疫学的反応 (即ち、アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいはホスホリラーゼCの刺激) を中和することが出来る。

また本発明には、飼育上許容出来る宿主中に、(x) 本発明の細胞レセプター、(y) 本発明の細胞レセプターの断片を持つポリペプチド、あるいは (z) 本発明の細胞レセプターに対する抗体を含む免疫複合体が含まれる。これらの免疫複合体は、本発明の細胞レセプターのリガンドによる過剰刺激を防止する種々の疾病を処置する手段を提供する。好適な実施態様において、本発明のポリペプチドにはPTHレセプター、PTHレセプターの断片、及びPTHレセプターと免疫複合体を形成する抗体が含まれる。これらのポリペプチド及び試体は、PTHあるいはPTHrPに関連する高カルシウム血症の処置を、これは関連のないものと差別するための診断ツールとして有用である。

本発明の複製プローブは、遺伝子工学の一般研究が、細胞レセプター同族体、あるいは本発明の細胞レセプターに関連した、いかなる動物由来にせよ、その細胞レセプターを特定し、クローニング化することを可能にし、本発明の配列の有用性を拡大する。

本発明の他の特徴と利点は、以下の詳細な実施態様の説明と請求の範囲から明らかになるであろう。

#### 発明の詳細な説明

先ず、図の簡単な説明をする。

図

図1はオギッサムの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、OK-Hをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. : 1)。

図2はオギッサムの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、OK-Oをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. : 2)。

図3はラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、R15Bをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. : 3)。

図4はクローンOK-O及びR15BからのcDNAにコードされている塩基とアミノ酸配列の比較である。

図5はOK-O、OK-HとR15Bの塩基とアミノ酸配列を配列順序に並べて並べて比較したものである。

図6はヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている塩基とアミノ酸配列の表示である (SEQ ID NO. : 4)。

図7はラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプターのcDNA、ヒトのゲノムDNAクローン及びヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている2つのcDNAクローンの略図である。

図8はヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターの塩基とアミノ酸配列の塩基性プロットである。下線される塩基ドメイン1-4が示されている。A、B、Cは追加の塩基性位置を示す。

図9はOK-Hを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

図10はOK-Hを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図11はOK-Oを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

図12はOK-Oを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図13はR15Bを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

ある。

図14はR15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図15はOK-H、OK-O、あるいはR15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによるイノシトールリン酸代謝の刺激を示すグラフである。

図16はCDM-B、OK-H、R15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによるサイクリックAMPの刺激を示すグラフである。

図17はヒトの腎臓 (AとC) 及びラットの腎臓 (BとD) のPTH/PTHrPレセプターをコードしているcDNA断片の (12) - 塩基対 (1-34) (AとB) 及び (123) - 塩基対 (1-36) (CとD) の結合を示すグラフである。結合するリガンドには、PTH (1-34) (□)、PTHrP (1-36) (●)、PTH (2-34) (■)、PTHrP (7-34) (△) が含まれる。データは特異的結合のパーセントとして示され、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準誤差を示すものである。

図18はヒトの腎臓のレセプターをコードしているcDNA断片における細胞内cAMPの刺激を示すグラフである。データは平均値±標準誤差を示し、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準誤差を示すものである。

図19はヒトの腎臓 (A) とSaeOS-2細胞 (B) から作られたcDNA (~1000 bp/レーン) のノーザンブロット分析の表示である。プロットはヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。28Sと18SのリボソームRNAバンドの位置が示されている。

図20はヒトのゲノムDNAをSaeI、HindIII及びXhoI (~1000 bp/レーン) で消化したもののサザンブロット分析を示す。プロットはヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。

図21はR15Bによってコードされているラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプターの細胞膜における免疫反応の略図である。





## 特表平6-506598 (7)

ローンはブランク法で精製され、ラムダファージDNAが分離された (Sambrook et al., 上記)。クロン化された導入断片は、ファージDNAから、制限酵素エンドヌクレアーゼ Hind III および EcoRI (ラムダGT10ライブラリー)、あるいはXhoI および ScaI (EMBLライブラリー) を用いて取り出され、次いで適当な制限酵素で消化された制限酵素断片を用いてpCDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA) 中にサブクローニングされた。CaCl<sub>2</sub> (溶液) で精製されたサブクローニングの配列決定は、Sanger (Biochem. 24: 5463, 1977) の方法に従い、ジデオキシターミネーション法 (Sequenase パージン 2 sequencing キット, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) によって行われた。

## 逆転写とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

3 µg のヒト腎臓癌由来のポリ(A) + RNA (Clontech, Palo Alto, CA) を 73.5 µl の水の中で 100°C で 30 秒インキュベートし、本用して反応を始め、20 µl の 5x RT 緩衝液 (1x RT 緩衝液: 40 mM トリス塩酸、pH 8, 2, 40 mM KCl, 6, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM β-mercaptoethanol と各 5 mM のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP))、2 µl (4 単位) の RNasin (Promega Biotech, Madison, WI)、1 µl (80 pmol/µl) のヒト cDNA プライマー H12 (5'-AGATGAGGCTCTGCAAGGT-3'; SEQ ID NO. 14) と 80 単位の前増強酵素の逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, FL) に加えた。反応混合液を 42°C で 40 分間インキュベートした。次いで、10 分の 1 倍の最初の液を混合する反応混合液は、PCR により、3 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM の dNTP、2 単位の前増強酵素 (New England Biolabs, Beverly, MA) と各 2 µM の正方向と逆方向のプライマー (PCR の条件: 変性、1 分間、94°C; アニリング、1 分間、50°C; 延伸、72

で 3 分間; 40 サイクル) を含む最終反応混合物 100 µl の中で増幅された。

2 つの独立した PCR は、以下の 2 つの異なる正方向のプライマーを用いて行われた: (1) 2 つの以前にクロン化された PTH / PTH + プレマプター G CC

(上述) コーディング領域に基づく逆転写プライマー PK-1 (5'-GCAAT TCCATGGGACCGGCTCCGAT-3'; SEQ ID NO. 15)、及び、(1) ヒトゲノムクローニング [G] の 5'-非コーディング領域に基づくプライマー PK-2 (5'-CGCGATCCCGCGGCGCTACCGCGT-3'; SEQ ID NO. 16)。両 PCR 反応はヒトの PTH / PTH + プレマプターのコーディング領域の 713 ~ 731 番目のヌクレオチドを覆うプライマー H26 (5'-AGTATAAGCGTCCCTGACGA-3') を用いた (図 4)。PCR の生成物はクローニングにより変換を準備し、EcoRV で切断されて、転写された pCDNA1 にクロン化された。

ノーザンブロット分析: 総 RNA は 5 AOS-2 細胞及びヒト腎臓癌からアミグダラマリンアネート (Chirgwin et al., Biochem. 18: 5294, 1979) によって抽出された。ノーザンブロット分析のため、~10 µg の総 RNA が 1.5% / 3.7% ホルムアルデヒドゲル上での電気泳動にかけられ、ニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上を参照)。フィルターは、0.5x SSC / 0.1% SDS の最終洗浄液で 30 分間、60°C で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

サザンブロット分析: ヒトゲノム DNA は SDS / プロテイナーゼ法 (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36: 32, 1973) を用いて生成された。サザン分析のため、~10 µg の DNA が 0.8% / 1% ホルムアルデヒドゲルによって消化され、0.8% アガロースゲル上の電気泳動にかけられ、ニトロセルロース膜 (Schleicher and

nd Schull, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上を参照)。フィルターは、0.5x SSC / 0.1% SDS の最終洗浄液で 30 分間、50°C で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

## 細胞分析

COS 細胞に発現されたクローニングレプレターの機能的特性を特徴づける実験は以下のものが含まれた:

1) PTH と PTH + P の断片及び細胞体の結合。

1.1) PTH と PTH + P の断片及び細胞体によるアイクタック A5P 細胞の形成。

1.1.1) PTH と PTH + P の断片及び細胞体による細胞内の遊離カルシウムの増大、及び

1.1.2) PTH と PTH + P の断片及び細胞体によるイノシトールリン酸代謝の活性化。方法は次の通りである。

## ラジオリセプターアッセイ

[N19<sup>9</sup>, N19<sup>12</sup>, Tyr<sup>34</sup>] bPTH-(1-34) アミド (N19 PTH) 及び [Tyr<sup>34</sup>] PTH + P (1-36) アミド (PTH + P) は Na<sup>125</sup>I (約 40 Ci, New England Nuclear, Boston, MA) により放射線 (Seeger et al., J. Biol. Chem. 254: 6980, 1979) に従ってラジオリセプター化され、逆相 HPLC によって精製された。細胞に送ると、標識されたペプチドは 0.3% のトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶かされ、C<sub>18</sub> Sephadex カートリッジ (Waters Associates, Inc., Milford, MA) にかける。0.1% TFA 中 60% アセトニトリル溶液によって洗脱された。逆相 HPLC 後、ラジオリガンドは、次いで、C<sub>18</sub> Sephadex カートリッジ (3.9 mm x 30 cm, Waters Associates) にかける。0.1% TFA 中 30-50% のアセトニトリルの線形勾配を用い、2 ml / 分の流速で 30 分かけて洗脱した。ラジオリガンドは、2 つのピークに別れて洗脱した。最

初のピークは約 38% のアセトニトリルのところで洗出し、より高い結合と特異的結合を示したので、この研究に用いられた。比活性は 500 ± 75 mCi / mg で、これは平均のノービーペプチド比 1 に相当する。

COS-7 細胞は 15 cm のプレートで、DMEM、10% の胎児血清 FBS、10 mg / L ゲンタマイシン中、80-90% の密着度まで培養された。D E / デキサメタゾン (Sambrook et al., 上記) により 1-2 µg のプラスミド DNA を導入した 24 時間後、細胞をトリプシン処理し、多次プラスチック皿 (直径 16 あるいは 35 mm, Costar, Cambridge, MA) に、細胞密度 5 × 10<sup>4</sup> 細胞 / cm<sup>2</sup> で再配分した。細胞数は移行後すぐに増加したのである。更に培養を 48 時間待たせ、ラジオリセプターアッセイが行われた。培養地は、研究用細胞、50 mM トリス-塩酸 (pH 7.2)、100 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、0.5% 胎児牛血清 (FBS)、5% 胎児牛血清 (FBS) を含む緩衝液と交換された。特に指示のない限り、研究は、細胞をこの緩衝液中、15°C、4 時間、4 × 10<sup>5</sup> cpm / ml (9.6 × 10<sup>-11</sup> M) の [125I]-標識の N19 PTH あるいは PTH + P とインキュベートして行われた。

インキュベーションは、緩衝液を吸い取り、空室性細胞を含む培地を 0.9% NaCl 溶液で洗い出し (3 回)、15 秒間待たせて洗脱することによって終了させた。細胞に結合した放射線は、各ウェルに溶液 (3 回) 1 N NaOH (200 µl) を加えることによって回収された。空室で 30 分間、この NaOH はガラス管に移された。二回目、三回目の 1 N NaOH (200 µl) による抽出を、一回目のものと合わせ、総放射線はスペクトロメーター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定された。細胞を含む培養液へのトレーサーの付着は、たとえ空室が洗浄地とブレインキャプションされても、無洗出される程度であった (加えられた洗脱液の 0.2% 以下)。

## cAMP 産生の測定

細胞内 cAMP の蓄積は既述 (Abou-Samra et al., J.

## 特 委 平 6-506598 (8)

B101, 64cm, 262:1129, 1986) のようにして測定された。  
 24穴プレート内の細胞を0.1%BSAと2mmMBSを含む培養液で洗浄した。次いで、細胞はPTMまたはPTSEFと15分間、37度でインキュベートした。上清を除去、細胞は直ちにプレート全体をドライアイス浴中に置くことによって凍結した。細胞内cAMPは1mlの50mM蔗糖10中での細胞を溶かすことによって抽出され、抗cAMP抗体(例、515mM, S.C. Lorenz, MO)を用い、特異的ラジオイムノアッセイによって分析された。cAMPの代わりにトレーサーとして用いられたcAMP類似体(2'-O-モノナトリウム・アデノシン3':5'-サイクリックモノリン酸トリメチルユステル、515mMより購入)は、クロロミント法により高度純化された。遊離のヨウ素は、ヨウ素化されたcAMP類似体を515mMエタノール・クロマトリッジ(Waters, Milford, MA)に吸着することによって除去した。  
 dH<sub>2</sub>Oで洗浄後、ヨウ化cAMP類似体はSephadexカラムから40%アセトニトリル(ACN)と0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)によって流出された。ヨウ化cAMP類似体は検出装置(例、1mM)の1%TFAにもとめ、0.1%TFAと0.1%シタラム(Waters)にて注入された。カラムを0.10%ACNの1%TFA溶液で平衡化し、0.1%TFA中、10-30%ACNの密度勾配で流出した。この操作によりモノ・ヨウ化cAMP類似体を、モノ・ヨウ化cAMP類似体から分離することが可能となる。トレーサーは-20度で凍結する時は、4ヶ月までは安定である。アッセイに用いられた標準品、アデノシン3':5'-リン酸は515mMから購入した。試料(1-10μl)のHCl(1M)添加液あるいは標準品(0.4-100fmol/チューブ)を50μlM酢酸ナトリウム(pH5.5)で希釈し、トリニチルアミンと塩素酸の混合液(容量比2:1)10μlでアセチル化した。アセチル化後、cAMP類似体を、PBS(pH7.4)、5mMEDTA及び1%正常ウシ血清中に作られた原液(1:4000)から加えた。トレーサーは、0.1%BSAを含むPBS(pH7.4)で希釈して加えられた(20, 0.06g/ml/チューブ)。アッセイは4度で一晩インキュベートした。結合したトレーサーは100μlのブドウ糖溶液(1:2, 0.85M)及び1mlの7%ホルミチレンジリッジ

ール(分子重さ4000-6000)を添加して沈殿させ、2000rpmで30分間、4℃で遠心した。上清を除き、結合した放射能をカウンタ(Micro medic)で測定した。細胞抽出はMicro medicから提供された4-バタメーラーIAプログラムを用いて測定した。典型的な例では、アッセイ精度は0.1fmol/1チューブで、トレーサの50%を覆う標準精度は5fmol/1チューブである。

CAMP 産生をアッセイする別法では、PTH/PTHrP 受容体 cDNA を導入された CHO 細胞は、プラスチックポリスチレンによって、10 mM トリス・塩酸 (pH 7.5)、0.2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM エチレンジアミン・四酢酸 (EGTA) (Sigma) と 1 mM ジチオソレイトール (Sigma) を含む溶液中に浸められる。細胞は密着に付いたダウンスホムोजェナイザーの 20 ストロークでホモジェナイズし、13、000 x g で 15 分間 4°C で遠心する (Eppendorf, 5412 型, Brinkmann Instruments, Inc., Woburn, NY)。細胞質液を含むペレットはダウンスホムोजェナイザーで 20 ストロークにより同じ緩衝液に再度懸濁し、更に同緩衝液で希釈して蛋白濃度を、Lowry の方法 (Lowry et al., J. Biol. Chem., 193: 265, 1951) で測定して約 1, 2 mg/ml とする。約 30 μg (250 μl) の原液、緩衝液の等容のサルモ、または緩衝液のみを 10 分間、37°C (最終温度、100°C) で、50 mM トリス・塩酸 (pH 7.5)、0.2 mM ATP、4 x 10<sup>4</sup> cpm [α-<sup>32</sup>P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA)、9 mM テオフィリン、4.2 mM MgCl<sub>2</sub>、26 mM KCl、0.12% BSA、及び 5 mM クレアチニン酸 (Schwartz/Mann Division, Section-Dickenson & Co., Orangeburg, NY) と クレアチンホスホキナーゼ (Schwartz/Mann) を含む ATP 所欠系とインキュベートする。インキュベーションは、該酵素を遮断することによって開始され、100 μl の 20 mM 塩化 NaP<sub>2</sub>、約 50, 000 cpm の [γ-<sup>32</sup>P] CAMP と 50 mM ATP を含む溶液を加えることによって終了させる。反応混合物を希釈し、生

成された<sup>[32P]</sup>cAMPはイオン交換カラム(Dowex 50 W-X4, Dorrad Lab, Richmond, CA)とアルミナ(Sigma)上の逆相カラムクロマトグラフィーによって精製される。<sup>[32P]</sup>cAMPはβ-シンチレーションカウンター(Packard Instrument, Inc., CA, U.S.A.)で、<sup>[32P]</sup>cAMPの回収に対する校正をして測定される。

細胞内電解カルシウムの測定

PTG/PIE: プレゼプター-cDNA を移入された細胞の細胞内シグナルレベルの測定は、Pur-2 AM (Pur-2 のアセトキシエステル, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を負荷した細胞を用いて行われた。方法論の詳細は以下の通りである:

CO<sub>2</sub>を飽和させたカパーガラスを、Fura-2 AMを封入し、以下のものを含む（mM濃度）緩衝液中にインキュベートした。HEPES (N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸))、20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; 4; グルコース, 30; および Fura-2 AM (1) - (2-(5'-カルボキシカサゾール-2'-イル)-5'-アミノペンゾフラン-3-オキシル)-2-(2'-アミノ-5'-メチルフエノキシル)エタノール, N, N', N'-トリメチルペンタアセチルメチルスルフェン, 0.5; 3.7℃で1時間、4、95%飽和と5%CO<sub>2</sub>とを45分間通した。Fura-2 AMを封入した細胞は、次いで、以下のものを含む（mM濃度で）修正トリス・ヘンゼライト（KB）緩衝液で洗浄した。HEPES, 20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; グルコース, 5; pH 7.4。ユスチルの開封が起きたことをチェックするために、Fura-2 AMの不完全な加水分解を反映していたが、3日分を隔てると、細胞スペクトルが Fura-2 の加水分解である約345nmにピークがあった。その後細胞の管を川で洗った。カパーガラスを炭酸ガスで脱気したチャンバ

Biophysics Technologies, Inc., MD) に  
属した。チャンパーは、シリコンカバーシールを持つテフロン製の蓋、液封の  
したコンパートメントからなっていた。カバーガラスはチャンパーの底の液封  
をした。カバーガラスを所定の場所に固定させるシリコンカバーには、ヒーター  
/クーリングが対じ込められていた。温度はヒーターに0-7、4ボルトを  
加えることによって、22度~37度の間で変動させた。温度を特定しない限り、  
実験は37度で進行された。チャンパーは国立健康院 (Cecil B. Moore, Jr.,  
Thomahood, NY) の設備に結着た。Fara-2の波長のために  
コンデンサー (Photon Technologies International  
Co. (PTI) Inc., NJ) の焦点におかれた75ワットのキセノン  
アーク灯で励起された。励起が過剰光刺激と交差する回転チャッパーによって  
与えられる四回屈折半導体光刺激が、波長測定に使用された。単色分光刺激の出力  
は調整されて一本の穴の開いた光路を形成し、制御可能な絞りを通して発光軸のハ  
ウリングを励起した。次いで、光は石英レンズを、そして100倍のニコン発光  
対物レンズを通して二倍位の絞を通過した。光源計算機システムによる検出が  
光の出力測定に使用された。データの分析は、M8-DUS操作系を附ける1B  
相互接続入/出286コンピュータにFara-2システムを接続して行った。デ  
ータは正確な二重一致形式に保存、記録された。

細胞内のカルシウム濃度は次式に従って計算された： $[Ca^{2+}]_i = K_d$   
 $(R_{max} - R) / (R_{max} - R)$  B。ここで、Rは340と380nmにお  
ける蛍光の強度の比であり； $R_{max}$ と $R_{min}$ は、夾、細胞内のカルシウム  
と実際上ゼロのカルシウムの存在下の、Fura-2の340と380nm励起  
波長における蛍光強度の比であり；Bは380nmにおけるゼロカルシウム存在  
下のFura-2の蛍光、細胞内のカルシウム存在下の存在に対する比であり；  
 $K_d$ はFura-2のカルシウムに対する解離定数である。 $R_{max}$ を測定する  
ために、実験の終末にイソノマイシンをFura-2を含有した細胞に加えて細胞  
内外 $[1mM]$ と細胞内環境の間の $Ca^{2+}$ を平衡化した。従って、 $R_{min}$ を計算  
するために、1mMのEGTAを細胞溶液に加えた。異なる密度では異なる  
細胞密度が得られた。340と380nmにおいては2.24mM、及び240と280nm

## 特表平6-506598 (9)

アにおいては135nmである。

## イノシトールリン酸の測定

PTH/PTHrPレセプターを導入されたCOS細胞におけるイノシトールリン酸の代謝レベルは既報の方法を用いて測定された (Bouvier et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990)。

## 結果

## 分子的特徴

2つの別種のクローン (OK-H及びOK-O) は、ともにOK細胞のcDNAライブラリーから分離されたが、およそ2kb程度の長さを有していた。これらのクローンの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は、それぞれ (SEQ ID NO. : 1) 及び図2 (SEQ ID NO. : 2) に示されている。RQ6細胞のcDNAライブラリーから分離されたR158クローンは、およそ4kb程度の長さであった。ラットの骨のPTHrPレセプターの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は図3 (SEQ ID NO. : 3) に示されている。

3つのcDNAクローンは、イニシエーター・メチオニンとして付着した膜者と予想されるメチオニン残基をコードしているコドンを持つという点によって完全な長さのものと推定される。これらメチオニンコドンの後には、「シグナルペプチド」配列であることを示唆する性質を持つアミノ酸配列 (DNAから導出) が続く。3つのレセプター・cDNAはすべて、G-蛋白結合受容体のレセプターに典型的なモデル、特定の7回-異相モデルへの「適合」を可能にする位置に塩基コドンを持つ。最も重要なことは、3つのクローン化されたレセプターが、すべて、リガンドと結合して活性化された時、細胞内のエフェクターを活性化する能力を有することである。これらの特性は、分離された3つのクローンすべてが、完全長のcDNAをエンコードすることを示唆する。

図4は、OK-O及びRQ6 158からのcDNAによってコードされているアミノ酸配列間の高度の相関性を示す。これら2つのレセプター間には、全体で87%の相同性があり、77.8%のアミノ酸の一致がある。このアミノ酸の

高い相関性にもかかわらず、配列の一致は、PTHレセプターのアミノ酸配列が活性化の上で高度に保持されていることを証明している。これは、OK-OとR158の両方からのデータをヒトを含む他の動物種に外挿することを可能にする。

図5は、3つのクローン化されたcDNAすべての決定されたアミノ酸配列を配列相同性によって一様に整列させたものである。OK-H配列はOK-OとG-蛋白結合受容体と同一である。ここでOK-O配列は全体で585アミノ酸残基を持つが、OK-H配列は515アミノ酸で止まっている。これは、OK-O配列と比べてOK-H配列に欠けている170のヌクレオチド (G) に起因し、前者におけるフレームシフトと止めの挿入に起因している。OK-OとOK-Hが2つの別種の遺伝子の産物か、あるいは異なる遺伝子の産物かは不明である。

G蛋白結合に共通したレセプターのいくつかは、イントロン挿入の過剰によってコードされている (Koblik et al., Nature 329: 75, 1987; Koblik et al., J. Biol. Chem. 262: 7321, 1987; Becker et al., Mol. Endocrinol., 6: 70, 1992; Koblik et al., Science 238: 650, 1987; Bonner et al., Science 237: 527, 1987; Svehl et al., Nature 347: 80, 1990)。ヒトのPTH/PTHrPレセプター・cDNAを単離するために、ヒトcDNAライブラリーとヒトゲノムライブラリーの両方を、ラットの骨のPTHrPレセプターのコーディング領域の大部分を代表するプローブ (Bennell/Noti) を用いてスクリーニングした (図5)。ヒト骨髄のcDNAライブラリーのスクリーニングの結果、クローンOK-Hが分離されるに至った (図6) (SEQ ID NO. : 6)。ラムダGT10の2つのEcoRIクローニングサイトの1つが、ライブラリー・insertの結果、除去されたことが判明したので、cDNA断片及び3' kb (左) ラムダアームの~250bpを含むEcoRI/EcoRI断片をpCDNA1の位置する制限部位にサブクローニングした。DNA配列決定の結果、クローン化されたcDNAは、3'コーディング領域の~1000bpと、Aの多い3'末端を含む3'非コーディ

ング領域の~200bpを含むことが判明した。XhoI部位に於ける5'前コーディング領域は、次いでライブラリーを再スクリーニングするのに使用され、クローンOK-2の分離を得たが、これは、pCDNA1へのサブスクリーニング後、コーディング領域の~1400bpを含むことが判明した。ライブラリーの第三のスクリーニングに対しては、HindIII/PvuII/PstIが用いられた。分離されたクローンOK-3はOK-2と同一であることが判明した。

ゲノムライブラリーのスクリーニング (~10<sup>6</sup> pfu) の結果、4つの独立したクローンを分離された。これらのクローンの制限酵素消化断片のサザンブロット分析を定量的にcDNAのそれとの比較した結果、1つの1.5kbのゲノムクローン、HindIII (H) とHindIIIとも呼ばれる) は、SalIで消化された定量的ヒトゲノムDNAからの、ハイブリッドを形成するヒトDNAと同等サイズのScaI (S) 断片を含むことが判明した (下記参照)。3' SalI/ScaI断片を構成するハイブリッドを形成する2.3kbのScaI/ScaI cDNA断片と、~8kb XhoI断片は、共にpCDNA1にサブクローニングされた。さらにScaI/ScaI cDNA断片のサザンブロット分析の結果、ある~1000bpのBamHI/ScaI断片がヒトのPTH/PTHrPレセプターの一部をコードしており、これが、後に、既述のシグナルペプチドと~1000bpのイントロンによって中断されている5'非コーディング領域をコードしているエクソンを代表していることが判明した (図7)。

コーディング領域の長さ~450ヌクレオチドを分離するために、ヒト骨髄からのポリ (A) + RNAをHindIIIでライニングの後、消化した (図7)。1本融合後、2つの独立したPCRを以下の2つの別種の正方向プライマーを用いて行った：1) 2つの原因にクローン化されたPTH/PTHrPレセプター、OK-OとR158の5'非コーディング領域に基づく逆転写プライマーOK-1、及び、2) HPG1の5'非コーディング領域に基づくプライマーOK-2である。OK-2は同様の逆転写プライマーとして用いられた。サザンブロットおよび制限酵素分析によって、ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている増幅されたDNAの予想されたサイズが確認された。ヒトのPTH/PTHrPの5'末端をコードしている半構造域のPCR産物は、既ク

ローン化されたEcoRV部位を用いてpCDNA1にクローン化された。5' PCRクローンの配列位置によって、これらの5'ヌクレオチドの塩基は正方向プライマーの配列の違いによることが確認されたが、それ以外は同一の配列であることが明らかとなった。ヒトのPTH/PTHrPレセプター・cDNAの両側のヌクレオチド配列決定により、593アミノ酸残基を持つ蛋白質をコードしている開放読取り枠が明らかとなった (図8, SEQ ID NO. : 4)。

完全長のヒト骨髄のPTH/PTHrPレセプター・cDNA、HKKkは、PCRクローンOK-2とOK-2のHKKk/PCV1断片を用いて構成された。ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAを用いて、ヒト骨髄とBOS-2細胞からの総RNA (~10µg/レーン) のノーザンブロット分析の結果、~2.5kbの1つの主要なハイブリッドを形成するDNA断片が明らかになった (図9)。通常のヒトゲノムDNAのXhoI消化物は、同じ完全長のcDNA (図20) でプローブされると、1つの主要な約5.5kbのハイブリッドを形成する種と、約1kbのハイブリッドを形成する4と8kbの2つのDNA断片が現れた。これらのデータは、ヒトのPTH/PTHrPレセプターが単一の遺伝子の産物であることを示唆している。完全長のクローンは、次いで、細胞的及び生物学的特性試験のため、上部の方法によりCOS細胞に一過性に発現された。

ヒトのレセプターのオリガヌム骨髄のPTH/PTHrPレセプター及びラットのPTH/PTHrPレセプターとの比較により、夫々、81%と91%のアミノ酸配列の同一性が明らかになり、結果として非常に類似した配列性プロットを示した (図8)。すべての制限酵素サイトは、決定シグナルペプチドにおける2つのシステイン残基を含めて、すべての可能性のある配列のN-糖基化部位のように、保存されている。ヒトの骨髄とラットの骨のPTH/PTHrPの間で同一でないアミノ酸のいくつかは、ヒトとラットのレセプターの間では保存されていることが判明した。これらの保存されているアミノ酸残基は、51位のArgからLys、58位のArgからPro、262位のArgからHis、358位のAspからHis、422位のIleからThr、及び、427位のThrからLysである。

特表平6-506598 (10)

## 生物学的性質の検討

オキザムとラットのPTII/PTIIIレセプターの生物学的性質の遺伝的変異の検討は一過性に導入されたCOS細胞において、放射線リガンドとして<sup>125</sup>I-PTHrPと<sup>125</sup>I-NIePTHの両方を用いるラヂオレセプターアッセイにより、また、リガンドによるcAMPの蓄積、細胞内遊離カルシウムの増加、及びイノシトールリン酸代謝の促進を測定するバイオアッセイにより、上記の方法によって行われた。

図9はOK-Hを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、無発のPTII(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロリン置換を持つ)PTII断片体が結合の結合阻害剤として用いられた場合、PTIIrPの結合が阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-NIePTHの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTIIとPTHrPは共にOK-Hによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図10は、OK-Hを発現しているCOS細胞が、NIePTHに結合すると細胞内の遊離カルシウムの濃度を増大するが、OK-HあるいはR15Bレセプターを発現しない(図12と図14)、NIePTHで刺激されているCOS細胞と比べると、増加は低減が低い(平均±39nm)、あるいは全く低いことを示している。OK-HあるいはR15Bを発現しているCOS細胞とは異なり、OK-Hを発現しているCOS細胞はNIePTHで刺激された時、イノシトールリン酸代謝の増加は検出されない(図15)。

図11はOK-Hを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無発のPTII(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロリン置換を持つ)PTII断片体が

結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-NIePTHの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTIIとPTHrPは共にOK-Hによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図12はOK-Hを発現しているCOS細胞が、NIePTHとPTHrPによる刺激後、細胞内の遊離カルシウム濃度及びイノシトールリン酸代謝の増加を示している(図13)。

図13はR15Bを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無発のPTII(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロリン置換を持つ)PTII断片体が結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-NIePTHの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTIIとPTHrPは共にR15Bによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図14は、R15Bを発現しているCOS細胞が、OK-Hを発現しているCOS細胞が刺激された場合と同程度に細胞内カルシウム濃度を増大することを示している。

図15は、R15BあるいはOK-Hを発現しているCOS細胞が、NIePTHあるいはPTHrPによる細胞の刺激後、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)とイノシトール二リン酸(IP<sub>2</sub>)の蓄積の急速な増加によって証明されるように、フォスファジイノシトールの加水分解速度を増大することを示している。従って、OK-Hを発現しているCOS細胞は、NIePTH、あるいはPTHrPによる刺激後、イノシトール三リン酸とイノシトール二リン酸の蓄積に似る増加も検出出来なかった。これらのデータは、R15BとOK-HによってコードされているPTIIレセプターはホスホリパーゼCに、恐らくG<sub>s</sub>を介して共

役していることを示唆する。OK-HとOK-Hの間の唯一の違いはC末端塩基にあるので、これらのデータはOK-HとR15BによってコードされているPTIIレセプターのC末端はホスホリパーゼCの活性化に関与していることを強く示唆する。

図16は、R15BとOK-Hを発現しているCOS細胞が、NIePTHによる刺激後、cAMPの蓄積を増大することを示している。同様の結果は、OK-Hを発現しているCOS細胞においても得られた。cDNAライブラリーのみを導入されたCOS細胞ではcAMPの蓄積は認められなかった。これらのデータは、アデニル酸シクラーゼに共役しているPTIIレセプターは、レセプターのC末端の細胞質側の完全長の塩基を必要としないことを示唆している。これらのデータは、OK及びR15B細胞のcDNAライブラリーのスクリーニングからクローニングされたPTII/PTIIIレセプターのすべてが、同ペプチドのアミノ末端リガンドを同等に結合することを示唆している。リガンドによるこれらのすべてのレセプターの活性化は、アデニル酸シクラーゼを、恐らくはグアニンシクロオキシダーゼ(グーニルシクラーゼ)の1つの活性化を通じて、刺激する(細胞内cAMPの増加によって測定されるように)。G-蛋白質は、三量体ペプチド結合を持つ。そのうち、サブユニットの1つ、アルファは、大々、別個であるが、他の2つ、ベータとガンマは同一、または同源性が高い。これらG-蛋白質の1つ、(G<sub>s</sub>)はG-アルファ「刺激性」(G-アルファ-s)を含み、これはアデニル酸シクラーゼの活性化に関与する。

リガンドのOK-Hへではなく、OK-HとR15Bへの結合もまた、細胞内の遊離カルシウムを増加してイノシトールリン酸代謝を刺激する。これらの結果は、OK-HとR15Bレセプターのリガンドによる活性化は、共に第2の細胞内エフェクター、ホスホリパーゼCの刺激をもたらすことを強く示唆している。これらの活性化されたレセプターとホスホリパーゼCとの共有結合は、G<sub>s</sub>とは全く異なるG-蛋白質であるらしい。対照的に、カルボキシ末端で切り取られて活性化されたOK-Hレセプターは、活性化された時の他の塩基が、ホスホリパーゼCを活性化しないか、あるいはホスホリパーゼCを効果のない活性化をするのかを調べる。

PTII/PTIIIレセプターのカルボキシ末端部の生物学的役割は、同様にR15Bを、そして481位に終止コドンを導入された上流プライマーとを用いる標準PCR法により、カルボキシ末端短縮クローンレセプターを生成することによって、さらに検討された。同様に述べると、上流プライマーはラットcDNA配列(図3: SEQ ID NO. 13を見よ)の1494-1513番のアミノ酸に基づく合成オリゴヌクレオチドで、これは終止コドンとXbaIクロニング部位が加えられたものであった。30例のPCRサイクルが行われ、各サイクルは変性92℃、1分; アニリング60℃、1分; 延伸72℃1分からなっていた。生成物はNsiIとXbaIによって切断され、ゲル電気泳動によって精製された。R15Bは、XbaIとNsiIによって断片化され、精製されたPCR生成物は、次いで、XbaI-NsiIで切断されたR15Bベクターに連結された。その結果出来たプラスミド、R48Bは細胞内で増殖され、配列が決定された。

R48Bは、591アミノ酸断片を持つレセプター中のものと同一480のアミノ酸をコードしている。この塩基配列はCOS-7(一過性発現)とCピロ細胞(安定発現)に発現された。産生レセプター、R48Bと自然型レセプター、R15Bを発現しているCOS-7とCピロ細胞は共にPTHrP(1-34)を同等の親和性を持って結合する。活性化されると、R48Bは、正常型レセプターと同様にCOS-7とCピロ細胞におけるcAMP蓄積を刺激した。正常型レセプターとは対照的に、R48BはPTHrPで刺激された時、COS-7細胞、あるいはCピロ細胞にも[C<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>イオンの増加を誘発しなかった。これらのデータは、PTHrP/PTHrPレセプターによるホスホリパーゼCとアデニル酸シクラーゼの活性化に対する分子的要因性はお互いに異なっていることを示唆し、PTHrP/PTHrPレセプターのカルボキシ末端部のホスホリパーゼCとの、しかしアデニル酸シクラーゼではない、活性における互補的な役割を指摘している。結果、活性化されたPTHrP/PTHrPレセプターが適切なG-蛋白質および/または細胞内のエフェクター分子を活性化する可能性もまたある。

クローニングされたPTII/PTIIIレセプターを導入されたCOS-7細胞の分析によって、放射線PTII(1-34)とPTHrP(1-36)

特表平6-506598 (41)

( $\sim 200,000$  cpm)が発見されたレセプターに、R35D (特異的結合: 夫々、8.1+3.5%と7.1+4.1%)を発見しているC08-7細胞に対して観察されたのと同様の効果 (特異的結合: 夫々、1.9  $\pm$  3.7%と7.6  $\pm$  0.0%)で結合することが明らかとなった。発見されたヒトPTH/PTHrPレセプターは、ラット骨のレセプターよりも2倍高い見掛けのKdでPTH (1-34)と結合した。5 nM対10 nM (図17)。しかしながら、それらの高度のアミノ酸配列にも拘らず、2つのレセプターはPTH (3-34)とPTH (7-34)に対する親和性に著しい差を見せた。PTH (3-34)はヒトのPTH/PTHrPレセプターに対し、ラットのレセプターに対するよりも2から4倍低い親和性を示した (R35Dに対する5 nM対15 nMに對する $\sim 20$  nM)。このことはPTH (1-36)がヒトリガンドとして用いられた時の方が、さらに著明であった。PTH (3-34)及びPTH (7-34)に対する親和性は、発見されたR35Dの方がR15Bよりも7から10倍も高かった (PTH (3-34)に対して、夫々、7 nM対45 nM; PTH (7-34)に対して、夫々、60 nM対200 nM)。いずれかのレセプターを発見しているC05細胞において、PTH (1-34)もPTH (3-36)は共に細胞内の遊離カルシウムとcAMPの量を同程度に増進した (図18)。

#### PTH/PTHrPレセプターの関係

ヒトのPTH/PTHrPレセプターのアミノ酸配列は、ラット、真核細胞からのPTH/PTHrPレセプターと比べて、非常に高度の相違を示すが、オポウム、有袋動物のPTH/PTHrPレセプターとの配列の相関性はそれほど著明ではない。オポウムの有袋及びラットの骨のレセプターのように、ヒトの骨髄のレセプターは、PTHまたはPTHrPで刺激された時、細胞内のcAMPと遊離カルシウムの増加を誘起する。ヒトのPTH/PTHrPレセプターもオポウム及びラットの同種骨髄の高度の相関性にも拘らず、一過性に増進されたヒトのレセプターは、ラットの骨のレセプターとは異なる特徴を持っている。これには、PTH (3-34)に対するやや高い親和性とPTH (1-36)に対する著しく低い親和性が含まれる。より高い親和性はPTH

(3-34)と特にPTH (7-34)に対して認められ、そのヒトのレセプターに対する親和性は、PTHレセプターと比較して約35倍も高かった。これらの発見は、PTH/PTHrP自体の骨髄の細胞に異なる意味を持つかも知れない。それは従来典型的な組織は、インビトロでアンタゴニスト (とアゴニスト)の有効性検査に対する適当な組織であることを示すからである。

#### PTH/PTHrPレセプターの他のレセプターに対する関係

PTHとPTHrPレセプターの生化学的性質は、これらがG-蛋白を介したレセプターとして知られているPTHレセプター分子のメンバーであることを示唆している。よく調べられているG-蛋白レセプターの典型的特徴は、それらがすべて、数個の連続した疎水性アミノ酸からなる少なくとも7つの領域を持ち、これらの領域の各々が膜を通過するのに十分な長さのものであることである。

G-蛋白を介したレセプターの3つのサブファミリー、GTPドレセプターファミリーと呼ばれるものには、GTPドレセプター (甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン)及びGq/12レセプター (平滑筋細胞刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン)が含まれる。これらのレセプターは、すべて以下のような特徴がある: (1) リガンド結合ドメインの一部またはすべてを含むと思われる短いN-末端領域 (300アミノ酸残基よりも大)を持ち、(2) 著しいアミノ酸配列の相違、特に、7つの塩基性ドメインに由来することである。もう一つのサブファミリー、G12/13レセプターファミリーと呼ばれるものには、Gq/12レセプター (平滑筋細胞刺激ホルモン)及びG12/13レセプター (平滑筋細胞刺激ホルモン)が含まれる。これらのレセプターは、すべて、特に7つの塩基性ドメインにおける著しいアミノ酸配列の相違に加えて、比較的に短い (25-75アミノ酸) 塩基性アミノ酸配列のドメインが特徴である。これらのレセプターのリガンドによる活性化は、多数の塩基性ドメインの内少なくとも一つが関与すると思われる。レセプターのアミノ酸配列が異なることは思われない。

ラットのPTH/PTHrPレセプター (図3)の塩基性アミノ酸配列から推定されるいくつかの塩基性残基は、PTH/PTHrPが1つのG-蛋白を介した

のレセプターであることを示唆している。アミノ末端は、3つの塩基性ドメイン及び3つの塩基性ロイシン残基を含むシグナルペプチドの特性を示す。この20-28アミノ酸残基からなるアミノ末端は、他のG蛋白を介したレセプターのN-末端ドメインに属するアミノ末端のように、リーダー配列として設定つかない。また、塩基性ドメインを代表する7つの塩基性残基の位置がある (図19)。

オポウムの骨髄、ラットの骨、及びヒト骨髄のPTH/PTHrPレセプターの手続きされるアミノ酸配列は、これらがG-蛋白を介したレセプターファミリーのいずれにもよく当て嵌まらないことを示唆している。ラット及びヒトのPTH/PTHrPレセプターのGTPドレセプター及びアドレナリン受容体/ムスカリン受容体ファミリーとの全般的な類似性はおよそ10から20%であるが、塩基ドメイン内の相関性はこれより著明でない。従って、これらの領域に出て来る塩基性アミノ酸のすべては保たれているので、当然のことと予想される。20%の類似性は、これらサブファミリーの夫々のメンバーとして一般に受け入れられているレセプター間で見出される相関性よりも著明に低い。加えて、これらの配列には、限られた重複に加え、強い相関性 (即ち、互換性を持つアミノ酸配列)として特徴付けられるようなものを持つ部分は全く存在しない。

新たに特性が判明されたセクレチン及びカルシトニンレセプターとの厳密な類似性 (Shihara et al., EMBO J., 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1992)によって、これらのレセプターとPTH/PTHrPレセプターの間には30から40%の同一性があることが判明している。PTH/PTHrPレセプターはカルシトニンレセプターよりも100倍以上アミノ酸が長いけれども、オポウム骨髄のPTH/PTHrPレセプター (SEQ ID NO. 2)とオポウムのカルシトニンレセプター (GenBank 登録番号 M74420)のアミノ酸配列の間に $\sim 32$ %の一致がある。塩基性ドメインV11の18アミノ酸のうち17の残基は同一である。また、4つのN-末端グルコシル化部位のうち2つ、及び8つの糖鎖システインとして可溶性のあるもののうち

7つの位置が保守されている。2つのレセプター間の主要な差異は、それらのN-末端とC-末端ドメインにあると思われる。ラットのセクレチンレセプター (GenBank 登録番号 X59132)とヒトのPTH/PTHrPレセプターのアミノ酸配列の比較により、塩基性ドメインV11の25のアミノ酸のうち21の塩基が一致している。これら2つのレセプター間には43%の相関性のあることが示唆されている。PTH/PTHrP、カルシトニン、及びセクレチンのレセプター間の相関性は、これらが7個の塩基性ドメインに共通してアデニル酸シクラーゼを活性化させるレセプターの新しいファミリーを代表することを示唆している。これらのレセプターのアミノ酸配列が与えられれば、この塩基性ドメインの配列を比較し、一致して塩基性ドメインに属する領域を求め、このファミリーに属する他のレセプターの確認と分離に用いることが出来るであろう。

#### クローンの寄託

特許手続の目的のための微生物寄託についての国際的承認に関するブラスト契約の下に、cDNA発現プラスミドR15B、OK-Q及びOK-H: ファージPG1; 及びヒトのクローンの一部を含むプラスミド (登録B6)が、American Type Culture Collection (ATCC)に寄託され、そこでは、夫々の登録番号ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998, 及び68570を付けられている。中興の寄託代理人、The General Hospital Corporationは、ATCCがこの寄託の承認性と、もし、許可が許可された場合には、その寄託を促進する寄託所であることを申し立てる。このように寄託物質の寄託に関するすべての制限は、特許の許可と共に設けられることなく撤去される。寄託は特許申請の未決期間中は、37 CFR 1.14及び95 U. S. C. 122の下、コピシャリーによって食料ありと決定された者に提供される。特許された物質はあらゆる必要な進取を伴って提供され、寄託されたプラスミドの試料提供に対する最も新しい義務は少なくとも5年間、そして、いかなる場合でも、寄託の日付後、少なくとも30年の期間、あるいは特許の発行

## 特表平6-506598 (12)

期間、いずれか長い方の期間、生存状態で、汚染されないように保存を継続する。申請者の指定代理人は、もし、荷役物の状態のために、監視があっても荷役物が汚染を発生出来ないならば、荷役物を取り替える責任のあることを認める。

## ポリペプチド

本発明によれば、ポリペプチドには、例3-3及び6に示す、示されているオボニン、ラット及びヒトの前甲状腺ホルモンレセプター、及びいかなる他の自然界に存在するレセプターにせよ、これらのレセプターをクローン化して発現するのと同じ方法に類似の方法により、あるいは、ここに記述されている配列の1つの全体または一部をプローブとして利用する方法によって生成され得るものを含む。さらに、前甲状腺ホルモン、または前甲状腺ホルモン関連蛋白質に対する結合性のあるPTHレセプターの類似体あるいは断片も本発明の範囲内にある。

異なる特定のレセプター類似体には、側鎖アミノ酸配列によってのみ異なる。例えば、同じクラスの他の代わりに1アミノ酸の置換（例えば、グリシンの代わりにバリン；セリンの代わりにアルギニン、等）、あるいは、1つ、またはそれ以上の非同義アミノ酸の置換、欠失、または前甲状腺ホルモン、または前甲状腺ホルモン関連蛋白質に結合するレセプターの能力を破壊しない位置にされた挿入によってのみ異なるアミノ酸配列を持つ完全長、あるいは部分長のレセプター断片が含まれる。

特に関心のある特定のレセプター断片には、これらに限られるわけではないが、レセプターの部分で、一次アミノ酸配列からChou-Fasman法（例えば、Chou and Fasman, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251, 1978参照）のような疎水性/親水性計算を用いて加算外であると推定されたものが含まれる。親水性ドメイン、特に少なくとも10個のアミノ酸からなる疎水性区画（参照、異性ドメイン）は、細胞外ドメインの能力を破壊するとして現れて来る。図21は、1つのPTHレセプターの細胞外、細胞内及び細胞ドメインの手配される配置を示している。

特定のPTHレセプター断片の例には、以下Bクローンの遺伝子アミノ酸配列に由来する以下のアミノ酸配列（括弧の文字記号で示されている）が含まれ

ている：

## 細胞外ドメイン：

RP-1: TNETREAREVFDRLGHIYTVG (SEQ ID NO. : 5)  
 RP-2: VLYSGFTLDEAEELTSEEL (SEQ ID NO. : 6)  
 RP-3: VTFFLYFLATNYYWILVEG (SEQ ID NO. : 7)  
 RP-4: Y-RATLANTGCWDLGSOHKKWIIQVP (SEQ ID NO. : 8)  
 RP-5: PYTEVSGTLWQIQMHYEM (SEQ ID NO. : 9)  
 RP-6: DDVFTXEEQIFLLHRAQA (SEQ ID NO. : 10)

## 細胞内ドメイン：

RP-7: FRRLNCTRYN (SEQ ID NO. : 11)  
 RP-8: EXKYLGWFTL (SEQ ID NO. : 12)  
 RP-9: VLATKLRETNAGRCDETRQYRKLK (SEQ ID NO. : 13)

これらの断片はKusmannらの方法（*Endocrinology* 117: 1230, 1984）によって合成され、HPLCによって精製された。ポリペプチドの発現

本発明によるポリペプチドは、本発明の細胞レセプターの一部または全体をコードしている配列を持つ組織培養細胞から、なにか適切な発現系、例えば、適切な宿主細胞（原核あるいは真核）の、適切な発現媒体（例、pCDNA1）内の発現装置による発現装置を用いて、発現することにより生成することが可能である。正確にいかなる細胞を用いるかは、本発明にとって重要ではない。しかしながら、本発明のポリペプチドがPTH/PTHrP/PTHレセプターの全体または一部

を含む場合には、以下の宿主細胞が好適である。COS細胞、L-PC-RK1細胞、OK細胞、AET20細胞、及びCHO細胞。移入の方法及び発現媒体の選択は適切な宿主系に依存する。細胞系への移入の方法は、例えば、Absbel et al., (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989)に記載されており、発現媒体は、例えば、*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (P. H. Fowles et al., 1985, 編著, 1987)に記載されているものから選んでもよい。安定に移入された細胞は、レセプターDNAを宿主細胞の染色体に組み込むことによって作ることが出来る。適切なDNAは、pCDNA, pCDNA1-Neo, あるいは他の適切なプラスミドに挿入され、次いで、細胞は、このプラスミドにより、pSV-2-Neo, あるいはpSV-2-DHFRとの共同移入をして、あるいはしないマウス細胞が永続的に増殖し、及び/あるいはDEAE/デオキストラリン法によって移入される。移入された細胞の選択は、薬物的に上昇するレベルのG418 (*Geneticin*, G418)で、そしてもし必要ならば、ノトトレキサートを用いて行われる。

本発明のポリペプチドをコードしているDNA配列は、また、宿主細胞内にも発現することが出来る。細胞内レセプター、あるいはレセプター断片をコードしているDNAは、細胞内発現系における発現をもたらすことの出来る例として、細胞内発現系に導入されたベクター上を運ばれる。もし細胞ならば、コーディング配列は、その5'-末端に、発現される蛋白質の宿主細胞の細胞膜への分泌をもたらす、それによって蛋白質の細胞とその後の分泌を容易にすることの出来る細胞のシグナル配列をなにかコードしている配列を含むものと出来る。最も頻りに用いられる分泌配列は種々のE. coliの分泌配列である。しかし、他の分泌配列もまた使用してよい。プラスミドベクターは、温度敏感、可逆的増殖のマーカ、及び宿主細胞に適合する様に由来する制限配列を含むものを用いられる。例えば、E. coliは、pBR322, これはBollivar et al. (*Gene* 2: 95, 1977)によって、3つの制限系に存在するプ

ラスミド、そのうち2つはSalmonellaの株から、1つはE. coliから分離されたものであるが、に由来する断片を有して構成されたプラスミドであるが、その構造を用いて複製することが出来る。pBR322は、アミノペプチドの構造において、発現される、あるいは破壊される多岐の選択可能なマーカーを提供する。一般に用いられる宿主細胞の制限配列（また、「開閉因子」とも呼ばれる）は、ここでは、助発的にオペレーター、リボソーム結合配列配列と共に、転写開始のためのプロモーターを含むものと定義される。転写の発現を指示するために一般に用いられるプロモーターには、ラムダー由来のP<sub>L</sub>プロモーター及びN-遺伝子リボソーム結合部位（Simalak et al., *Nature* 292: 128, 1981）ばかりでなく、β-ラクタマーゼ（ベムリナーゼ）、ラクトース（lac）（Chabot et al., *Nature* 198: 1096, 1977）及びトリプトファン（Trp）プロモーター系（Goodell et al., *Nucl. Acids Res.* 12: 4057, 1984）も含まれる。

本発明の細胞レセプター蛋白質は、以下のような性質を持っているので、細胞内に発現すると、それは細胞膜へ、部分的には膜を貫通して移動し、その結果、その一部は膜に埋め込まれて止まり、一部は細胞内に伸張し、一部は細胞内に止まる。このような埋め込まれた細胞レセプターを持つ細胞は、それ自身、本発明の方法の中で用いられるとよく、あるいは、レセプター蛋白質は膜から抽出され、精製されることも可能である。

細胞の蛋白質を細胞膜に固定止める資力を持つ蛋白質の疎水性部分を欠くベクター断片は、発現しても、膜に埋め込まれることは期待されない。これらが細胞内に止まるか、あるいは細胞外に分泌されるかは、分泌を促進する配列（例えば、シグナルペプチド）が含まれているか、否かによる。もし、分泌されれば、本発明のポリペプチドは細胞外から回収することが出来る。もし、そうでなければ、細胞は解体して、例示のポリペプチドは細胞の全内容から分離し得る。発現される可能性のあるポリペプチドの精製は、阻害はないが、以下のものが含まれる。

## 特表平6-506598 (13)

3) 図3に示されるようなラットの骨髄のPTII/PTIIレセプターの、限定リーゲ配列を含む、アミノ酸1-192からなるアミノ酸部分。

2) 図3に示されるようなラットの骨髄のPTII/PTIIレセプターの、限定リーゲ配列を除いた、アミノ酸27-192からなるアミノ酸部分。

3) 図3に示されるようなラットの骨髄の完全長のPTII/PTIIレセプター。

4) PR-1 (上記のような)。

5) PR-2 (上記のような)。

本発明のポリペプチドは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて容易に精製することが出来る。これらのポリペプチドの抗体、あるいはレセプター-抗原的リガンド(例、PTII/PTIIレセプターに対するモノクローナル抗体PTII-RP)は、セファロース 4 CB(イオン交換セファロース (Pharmacia))のような固相支持体に共有結合し、本発明のポリペプチドをなんらかの結晶化から分離するのに用いてもよい。一般的には、1mgのリガンドあるいは抗体がCNBrで活性化されたセファロース 4で17-20時間(室温下)インキュベートされる。セファロースは、1Mトリス塩酸(pH8)で洗淨して過剰の反応部位をブロックする。セファロース-PTII、セファロース-PTII-RP、あるいはセファロース-抗体は、次いで、粗ポリペプチドと抗原抗体反応液(例、図7、4)中、4で2時間インキュベートされる(室温下)。セファロースは、次いで、一般的にはカラムに充填され、急速にPBSで洗淨され(一般的にはカラム長の10倍)、水で透析した後(例、図11、85)で凍結される。凍結後、次いで、凍結乾燥により凍結され、その純度は、例えば、逆相HPLCで検査される。

## 抗レセプター抗体

本発明の抗レセプターあるいはレセプター断片は、専門家にはよく知られているいくつかの方法によって、モノクローナル抗体を生成する方法、及びモノクローナル抗体を生成する方法を含め、抗体を生成するのに用いることが出来る。例えば、PTIIレセプターの限定アミノ酸配列は、他のC蛋白発現細胞レセプターに発出される領域に類似した細胞外と細胞内とを区別する領域(図21を見よ)

いは1%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡法で検定された(もし、FITC-標識の第二抗体が用いられた時)。

抗体を生成するもう1つの方法は、抗原として細胞(例えば、レセプターをコードしているDNAを注入されたCOS細胞のような哺乳類の細胞)の表面に発現されている本発明の抗体の標識レセプター-蛋白質を利用する。このような細胞は、通常、例えば、DEAE-デキストランを注入により、細胞レセプターの高発の発現をコードし、すなわち、融合することの出来るベクターを用いて生成することが出来る。例えば、PTII/PTIIレセプターに特異的なモノクローナル抗体は以下の手順で生成される。

ラットの細胞系PTIIレセプターを細胞表面に高発に発現している細胞のCOS細胞をSantibacマウス(Crj:Charles River Laboratories, Wilmington, MA)の腹腔内(1P)に注射する。マウスは4週ごとに1P注射により追加免疫を受け、融合の3日前に、腹腔内(1V)追加免疫により追加免疫される。このマウスから脾臓細胞を分離し、ヒモロマ細胞と融合により融合する。ハイブリドーマは、標準のヒポキサンチン/アミノプテリン/チミン(HAT)媒体で選択的に選別される。PTIIレセプターを生成する抗体を分泌するハイブリドーマは、食物、細胞あたりPTIIレセプターのコピーを元素分析に発現する細胞系(例、COS17/2、あるいはOK細胞)で、通常の免疫の技術を用いてスクリーニングして選定される。PTIIレセプターに結合することの出来る抗体を生成するこれらのハイブリドーマは培養して、サブクローニングされる。次いでモノクローナル抗体の性質を頻りに検定するために、ラザレセプター及びcAMP刺激アッセイを用いる二次スクリーニングを行うことが出来る(以下参照)。

## PTIIレセプター-アングゴニスト及びアングゴニストのスクリーニング

本発明のポリペプチド及び抗体ならびに他の化合物は、PTII結合性、及びアングゴニスト的あるいはアングゴニスト的な性質について、ここに記載のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。

1例をあげると、標識の細胞上のPTIIレセプターを認識するこれらの抗体は、PTIIあるいはPTII-RPとPTII/PTIIレセプターへの結合に対し結合

を阻害した抗体(即ち、阻害抗体)ドメインを持つと思われる蛋白質を提示している。この情報は、レセプター-抗体複合体、細胞外に露出している残基のみがあり、従ってin vivoで抗体に提示されるであろう標識の選択を導くために用いることが出来る。このような領域の1つ、あるいはさらに多くを阻害する短いペプチドを合成し(例えば、化学的に、あるいは合成DNA技術により)、モノクローナル、あるいはモノクローナル抗体を生成するために動物(例えば、ウサギ、あるいはマウス)を免疫するのに用いることが出来る。例えば、上記のPTII/PTIIレセプターのペプチドの面もの(RP-1、RP-5、及びRP-6)は、通常の技術を用いて化学的に合成され、以下の手順によりウサギにモノクローナル抗体を生成するのに用いられる。

完全フロイントアジュバントで乳化された所定のペプチドの標品をウサギに皮下に注射する。追加免疫は、不完全あるいは完全アジュバントで、2週間隔で注射される。

抗体は2つの方法のいずれかを用いて精製される。第一に、抗体を1%正塩ウサギ血清で透析後、125I-標識PTII/PTIIレセプター断片と反応(例えば、Segment 1、上記)により24時間、4℃でインキュベーションする。結合した125I-標識PTII/PTIIレセプター断片は、非結合のものから、100mMの第二抗体(抗ウサギIgG, Sigma)を20倍に希釈したもの及び1mMの5%ポリニレングリコールを加え、次いで、2000rpmで30分、4℃で离心することによって分離される。上清を凍結し、ベレットをカウンタで、放射活性の分析をする。第二の方法では、自発型の(例えば、ROS 17/2, 8, OK, S405-2細胞)あるいは細胞系(例えば、ROS 17/2, 8, OK-OあるいはOK-Rを注入されたCOS細胞あるいはCOS細胞)PTII/PTIIレセプターを発現している細胞系が、選択的に抗体と4℃、20℃、あるいは37℃で1-4時間インキュベートされる。細胞をPBSで(3回)洗浄し、125I-標識(NEMO, Dupont)あるいはFITC-標識(Sigma)の第二抗体と1時間、4℃でインキュベートする。洗浄後(PBSで3回)、細胞は0.1MNaOHで溶解してカウンタで測定される(もし、125I-標識の第二抗体が用いられた時)、ある

する能力についてスクリーニングされる。細胞系にPTIIレセプターを発現している細胞は、125I-PTII断片である125I-NEMOあるいは125I-PTII-RPと、24時間のモノクローナルあるいはモノクローナル抗体の存在下、4時間、17℃でインキュベートされる。使用される抗体は、細胞系、細胞系、あるいは標準自発のものか、あるいは標識されたものである。インキュベーション後、細胞は結合緩衝液(例えば、生理食塩水)で洗浄、懸濁され、ガンマカウンタを用いて放射活性を測定分析される。PTIIレセプターへのPTII断片の結合を阻害する抗体は、競合的、非競合的あるいは非競合的と分類される。

抗体及びポリペプチドを含め、化合物は、それらのアングゴニスト的あるいはアングゴニストとしての性質につき、上記のcAMP蓄積、細胞内カルシウム、及び/あるいはイノシトール三リン酸のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。細胞系上にPTIIレセプターを発現している細胞は、PTII、PTIIレセプター-抗体、あるいは抗体を組み合わせるものと、3mM BMX (3-イソブチル-1-メチル-キサンチン, Sigma, St. Louis, MO)の存在下、5-60分間、37℃でインキュベートされる。サイクリックAMPの量は、上述のように、特異的ラジオイソトープアッセイによって測定される。PTIIレセプターへの結合に對してPTIIと競合し、且つ、PTIIのcAMP蓄積に対する効果を阻害する化合物は、競合的PTIIアングゴニストと見做される。反例に、PTIIレセプターへのPTIIの結合と競合しないが、なお、PTIIによるcAMP蓄積促進を阻害する(少なくとも、レセプター-活性化部位を妨害することにより)化合物は、非競合的アングゴニストと見做される。PTIIレセプターへの結合に對しPTIIと競合し、PTIIの存在あるいは非存在下にcAMPの量を制御する化合物は競合的アングゴニストである。PTIIレセプターへの結合に對してPTIIと競合しないが、PTIIの存在あるいは非存在下に、なお、cAMP蓄積を阻害する能力があるか、あるいはPTII阻害によって阻害されるよりも高い量を阻害する化合物は、非競合的アングゴニストと見做される。

## 使用例

本発明のポリペプチド、抗体、及び他の化合物は、本発明の抗レセプターと





## 特表平6-506598 (45)

ターからP T Hレセプターを発現するように工巧された。このような動物は、高いカルシウム含量と、鈍くより固い殻を持つ卵を産むことが期待される。

## 他の実施例

他の実施例は、以下の特許請求の範囲内にある。例えば、本発明の装置には、トリ、あるいは有袋類、げっ歯類、または人間のような哺乳類を含むいかなる哺乳動物種にせよ、これらから未分離された遺伝子、あるいはcDNAあるいはRNAを含む。オボソサム、ラット、及びヒトのような多様な動物種からのP T Hレセプターに対して証明された高度の相同性は、ここに開示されたP T Hレセプターの分離方法が、多様な動物種からの関連した細胞レセプターの分離に広く適用されることを示唆している。

## DNA及びアミノ酸配列のコピーング表

## (1) 一般情報

(i) 申請者  
Sagse, Gino V.  
Kornenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abdou-Badi  
Juppner, Harold  
Polite, John T., Jr.  
Schifano, Ernestina

(ii) 発明の名称: 副甲状腺ホルモンレセプター及びこれをコードしているDNA

(iii) 配列の長さ: 3

(iv) 送信住所

(A) 発行者 Fish & Richardson  
(B) 通り 225 Franklin Street  
(C) 郡 Boston  
(D) 州 Massachusetts  
(E) 国 U. S. A.  
(F) 郵便番号 02110-2804

(v) コンピュータの戻り可能型

(A) 媒体タイプ: 3.5" ディスケット、1.44メガビット記憶容量  
(B) コンピュータ: IBM PS/2 モデル 302あるいは55X  
(C) 作業系: IBM P. C. DOS (バージョン3.30)  
(D) ソフトウェア: ワードパーファクト (バージョン 5.0)

(vi) 送付の申請データ:

(A) 申請番号:  
(B) 提出日時:  
(C) 分類:  
(vii) 以前の申請データ:  
(A) 申請番号: 07/631.702

(B) 提出日時:

(viii) 代理人/代理事務所:

(A) 姓名: Paul T. Clark  
(B) 登録番号: 30,162  
(C) 協会/証明番号: 00786/071003  
(ix) 連絡通信情報:  
(A) 電話: (617) 542-5070  
(B) テレファックス: (617) 542-8906  
(C) テレックス: 200154

(2) 配列番号: 1 に対する情報

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 1862  
(B) タイプ: 核酸  
(C) 配列の形式: 2本鎖  
(D) トポロジー: 線状

(xii) 配列の記法: SEQUENCE ID NO: 1:

```

TGGGACGACG CAGGCTCTG CTAGCTCAGG GCGGACGCA CCGAGTGGG AAGCAGCTG 60
GCGGACGCTT TGGGACGCTG GCGGACGCTT GCGGACGCTT GCGGACGCTT GCGGACGCTT 120
      1
101 CAG AGC CTT GCG TTT CTC CTC TGC TGC TGC GTC CTC AGC TGC CTC 183
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
      10      15      20
201 CCA CCA CTC CTC GAT TGC CAT CAT CTC ATA AGC AGC CAG GAG CTC ACC 264
Tyr Ala Leu Val Asn Ala Asp Asp Val Phe Thr Tyr Glu Glu Gln Ile
      25      30      35
301 ATT CTT CTC GCG AGC CCG CAG CTT CAG TGT CAG CAG GCG CTC AAA CAG 364
Ile Leu Leu Asn Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Glu Arg Leu Tyr Glu
      40      45      50
401 CTC CTC AGC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 464
Val Leu Asn Val Phe Gln Leu Ala Gln Ser Ala Tyr Asp Tyr Met Ser
      55      60      65
501 AGC TCT CCA AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG 564
Arg Ser Ala Tyr Thr Cys Tyr Cys Cys Phe Phe Ala Glu Cys Leu Tyr Phe
      70      75      80
601 CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 664
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Cln Arg
      85      90      95
701 GCG TCG TCG CTA CTT GAG TGC GAG AGC ATT GTC TGC TGC CTT GCT GCA 764
Gly Ser Cys Ile Phe Gln Trp Asp Asn Phe Val Cys Trp Phe Ala Gly
      100      105      110
801 ATT GCG GCG AAG CTC CTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 864
Val Phe Gly Lys Val Val Ala Val Ser Cys Phe Asp Tyr Phe Tyr Asp
      115      120      125
901 TTT AAT CAG AAA GTC CCA GCT TAT GAG TGC TGC TGC TGC TGC TGC TGC 964
Phe Asn His Tyr Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Arg Ser Asn Gly Ser
      130      135      140

```





## 特表平6-506598 (18)

GGC ATT AAT AAT GGC GAG TGC CAG CTC OCT GGC GAT GGC AAG GCA GGC 1692  
 Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gly Leu Phe Gly His Ala Lys Phe Gly  
 130 133 145  
 GCT GCA GGC ACT GAG ACT GGA AGC GTA GCA GGC ACT ATC GGC GTC GTC 1740  
 Ala Phe Ala Thr Glu Thr Leu Thr Phe Val Thr Met His Val Phe  
 147 150 153  
 AAG GAG GAC GCA TTC GTT AAC GGC GGC TGC TGA GTC GTC GAT GAT GAG 1788  
 Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Gly Gly  
 160 163 166  
 GGC TGC GGC TGT GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC 1836  
 Ala Ser Gly Ser Ala Arg Phe Phe Leu Leu Gln Gln Gln Gly Thr Gly  
 171 174 177  
 ACA GTC AGC TACTGCGCA GAGGCGCT AGACTGCTCG GTCGCGGCA 1903  
 Thr Val Met  
 180

TCGACGAGT GCGCAGGAG CAGCTGCTTC GGTGCTGCTC TATTCGCGAT CTGACGAGT 1945  
 AACTGACGA AGCGAGGAG GAGCTGCTTC AGCGAGGAG GAGCTGCTTC GGTGCTGCTC 2001  
 AATTAATAT GGTGCTGCTTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC 2051

Met is claimed is:

請求されているものは以下の通りである:

210. 1  
 GCT ATT GCA ATG ATG TAC ACT GTC GGC TAC TCC ATC TGT GTG GGC TCC 691  
 Arg Leu Gly Met His Thr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser  
 185 188 191  
 GTC ACT GTC GGC GTC GTC GTC GTC GTC TAC TTT AGC AGC TTA CAT TGC 739  
 Leu Thr Val His Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe His Arg Leu His Cys  
 194 197 200  
 ACC GCA AAC TAC ACT GAG ATG CAT CTC TTC GGC TCC TTT ATC GTC GGC 767  
 Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg  
 203 206 209  
 GCT GTC AGC ATC TTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 835  
 Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Ser Ile Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser  
 212 215 218  
 ACA GAT GAA ATC GAG GGC ATC ACC TAC GAG GAG GTC AGC GGC TTC ACA 863  
 Thr Asp Glu Ile Gly Arg Ile Thr Ile Gln Gln Leu Arg Ala Phe Thr  
 220 223 226  
 GAG GGT GGC GGT GGT GAG AAC GGC GGT TTT GTC GGC TCC AGA GTC GGC 931  
 Glu Pro Phe Phe His Arg Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala  
 229 232 235  
 GTC ACC GTC TTT GTC TAC TTC TTC ACC ACC AAC TAC TAC TCC ATC GTC 979  
 Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Thr Ile Leu  
 238 241 244  
 GTC GCA GGC GTC TAC GTC GTC GGC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1017  
 Val Ile Gly Leu Cys Thr His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser  
 245 248 251  
 GAG AAA AAG TAT GTC TCC GTC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1075  
 Thr Lys Lys Tyr Ile Ile Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 254 257 260  
 TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1113  
 Val Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 263 266 269  
 ACT GAG TCC TCC GAG GTC GTC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1171  
 Thr Gly Cys Thr Asn Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 270 273 276  
 GTC GGC ATC GTC GCA GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 1219  
 Val Phe Ile Leu Ala Ala Ile Gln Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn  
 280 283 286  
 ATA ATC AGA GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 1267  
 Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Gln Thr Asn Ala Gly Arg  
 289 292 295

115. 1  
 TCGACGAGT GCGCAGGAG CAGCTGCTTC GGTGCTGCTC TATTCGCGAT CTGACGAGT 1945  
 AACTGACGA AGCGAGGAG GAGCTGCTTC AGCGAGGAG GAGCTGCTTC GGTGCTGCTC 2001  
 AATTAATAT GGTGCTGCTTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC 2051  
 Met is claimed is:  
 TCGACGAGT GCGCAGGAG CAGCTGCTTC GGTGCTGCTC TATTCGCGAT CTGACGAGT 1945  
 AACTGACGA AGCGAGGAG GAGCTGCTTC AGCGAGGAG GAGCTGCTTC GGTGCTGCTC 2001  
 AATTAATAT GGTGCTGCTTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC GGTGCTGCTC 2051

210. 1  
 GCT ATT GCA ATG ATG TAC ACT GTC GGC TAC TCC ATC TGT GTG GGC TCC 691  
 Arg Leu Gly Met His Thr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser  
 185 188 191  
 GTC ACT GTC GGC GTC GTC GTC GTC GTC TAC TTT AGC AGC TTA CAT TGC 739  
 Leu Thr Val His Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe His Arg Leu His Cys  
 194 197 200  
 ACC GCA AAC TAC ACT GAG ATG CAT CTC TTC GGC TCC TTT ATC GTC GGC 767  
 Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg  
 203 206 209  
 GCT GTC AGC ATC TTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 835  
 Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Ser Ile Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser  
 212 215 218  
 ACA GAT GAA ATC GAG GGC ATC ACC TAC GAG GAG GTC AGC GGC TTC ACA 863  
 Thr Asp Glu Ile Gly Arg Ile Thr Ile Gln Gln Leu Arg Ala Phe Thr  
 220 223 226  
 GAG GGT GGC GGT GGT GAG AAC GGC GGT TTT GTC GGC TCC AGA GTC GGC 931  
 Glu Pro Phe Phe His Arg Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala  
 229 232 235  
 GTC ACC GTC TTT GTC TAC TTC TTC ACC ACC AAC TAC TAC TCC ATC GTC 979  
 Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Thr Ile Leu  
 238 241 244  
 GTC GCA GGC GTC TAC GTC GTC GGC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1017  
 Val Ile Gly Leu Cys Thr His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser  
 245 248 251  
 GAG AAA AAG TAT GTC TCC GTC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1075  
 Thr Lys Lys Tyr Ile Ile Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 254 257 260  
 TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1113  
 Val Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 263 266 269  
 ACT GAG TCC TCC GAG GTC GTC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1171  
 Thr Gly Cys Thr Asn Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 270 273 276  
 GTC GGC ATC GTC GCA GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 1219  
 Val Phe Ile Leu Ala Ala Ile Gln Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn  
 280 283 286  
 ATA ATC AGA GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 1267  
 Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Gln Thr Asn Ala Gly Arg  
 289 292 295







特表平6-506598 (22)

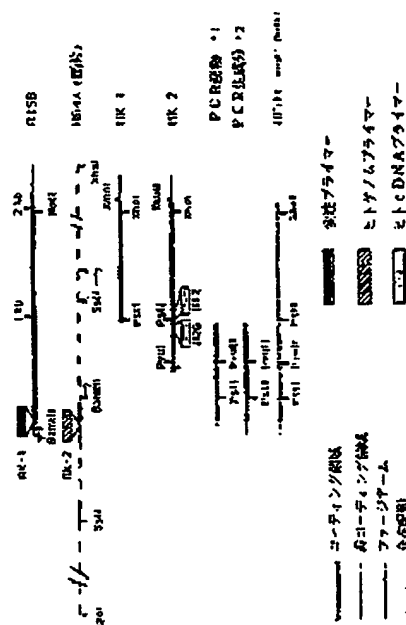


Fig. 7

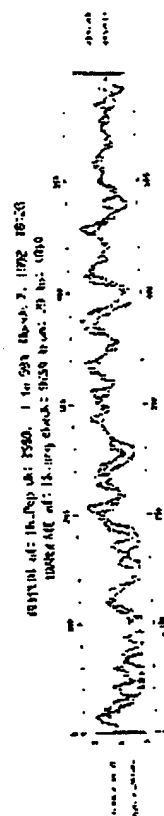


Fig. 8

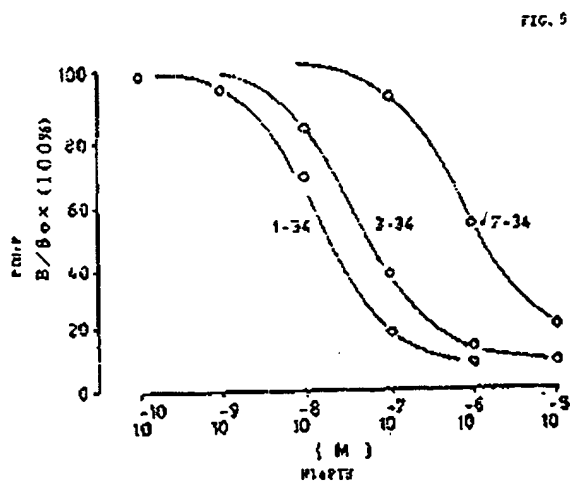


FIG. 9

B<sub>0</sub>: 特異的結合 (-N1ePTH)  
B: 実測値 (±N1ePTH)

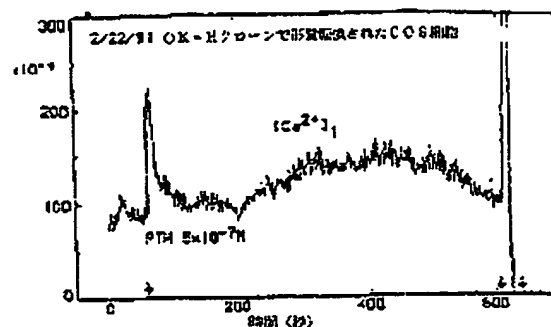


FIG. 10



特表平6-506598 (23)

FIG. 11

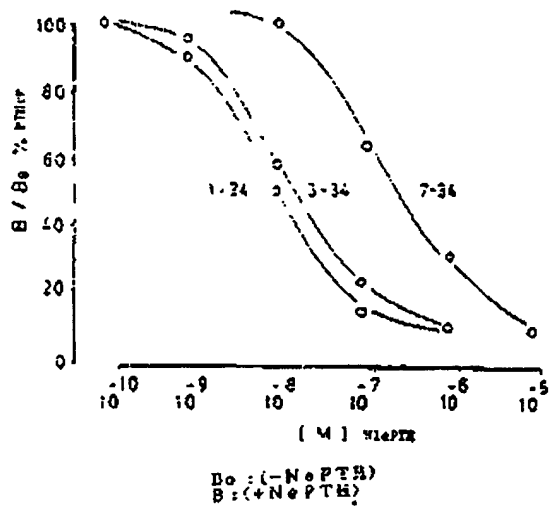


FIG. 12

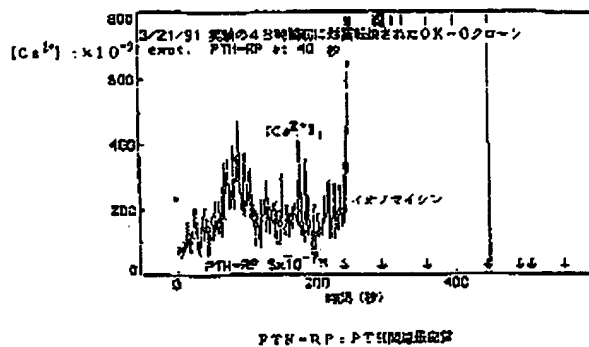


FIG. 13

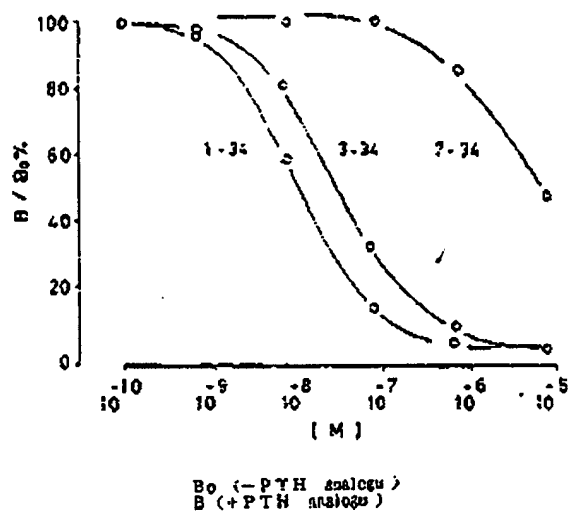
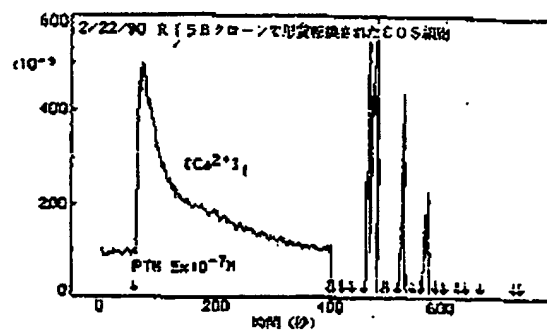


FIG. 13



特表平C-506598 (24)

FIG. 15

FIG. 16

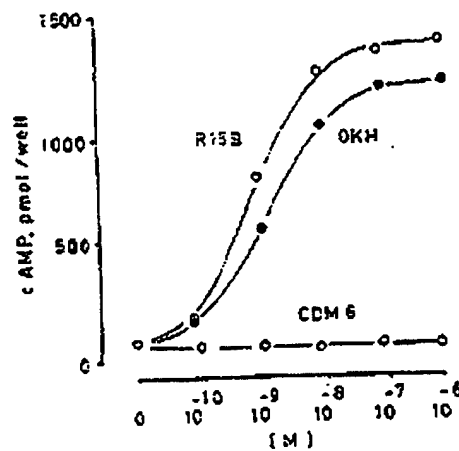
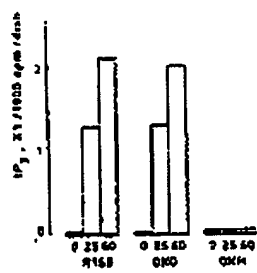
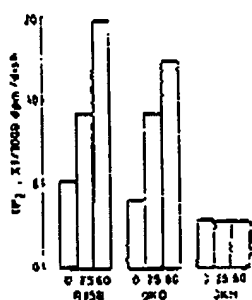


Fig. 17

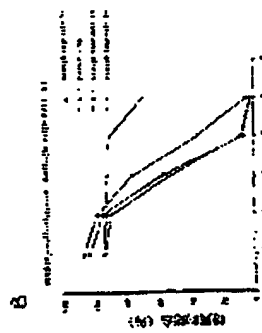
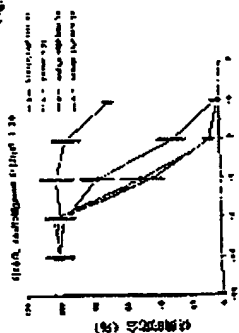
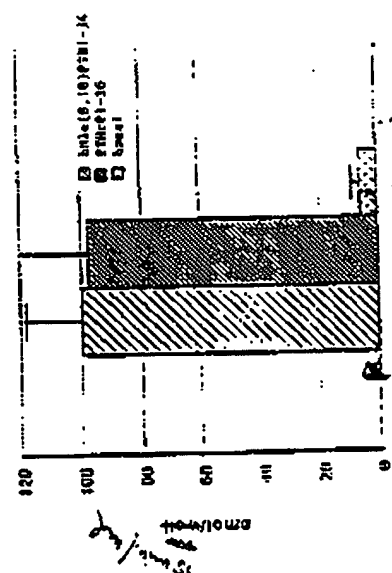


Fig. 18



特表平6-506598 (26)

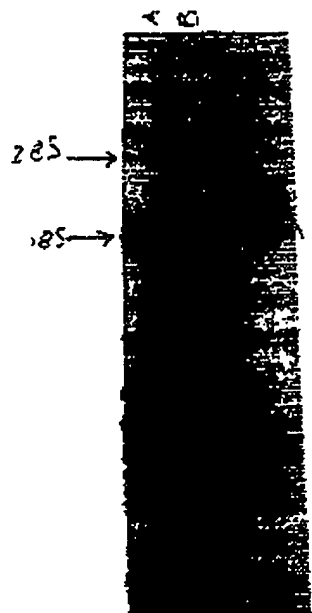


Fig. 19

Fig. 20

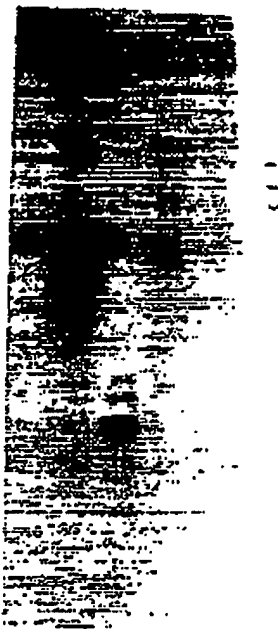
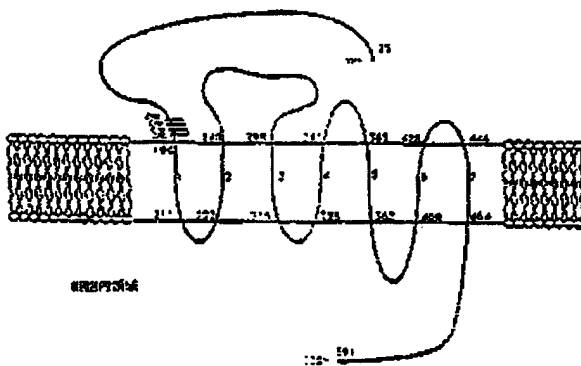


Fig. 21

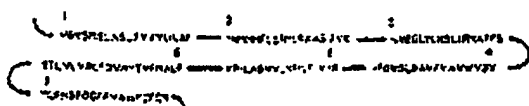
ラットの骨のFTIR/FTIR-PLSプロット

波長/波数



吸光度

7つの電気伝導率領域のFTIR/PLSプロット



情報開示報告書

Document disclosure No. 0000000000

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b></p> <p>USPC: Class. Sec. 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.</p>		<p><b>B. FIELD OF SEARCH</b></p> <p>USPC: Class. Sec. 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.</p>											
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Character of document, with location, where appropriate, of the relevant passage</th> <th>Reference to class No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>		Category	Character of document, with location, where appropriate, of the relevant passage	Reference to class No.	1	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10	2	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10	3	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10
Category	Character of document, with location, where appropriate, of the relevant passage	Reference to class No.											
1	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10											
2	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10											
3	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 24, NO. 1, 1957, 1-10. CHARACTERIZATION OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED NUCLEIC ACID SEQUENCE FROM HUMAN BONE CELLS. BIRTH DOCUMENT.	1-10											
<p><b>D. OTHER INFORMATION</b></p> <p>1. The document is a translation of the original document.</p> <p>2. The document is a translation of the original document.</p> <p>3. The document is a translation of the original document.</p> <p>4. The document is a translation of the original document.</p> <p>5. The document is a translation of the original document.</p> <p>6. The document is a translation of the original document.</p> <p>7. The document is a translation of the original document.</p> <p>8. The document is a translation of the original document.</p> <p>9. The document is a translation of the original document.</p> <p>10. The document is a translation of the original document.</p>													
<p>Date of filing of the document: 31 JUL 1992</p> <p>Date of filing of the document: 31 JUL 1992</p>													

from 6541A-750 (note change to 1173)

特表平6-506598

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年1月18日(2000. 1. 18)

【公表番号】特表平6-506598

【公表日】平成6年7月28日(1994. 7. 28)

【年号号数】

【出願番号】特願平4-510035

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61P 3/14

5/20

A61K 38/00

39/395

C07K 7/06

7/08

14/705

16/28

C12N 5/10

C12Q 1/68

G01N 33/15

33/566

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/00 603 Q

605 K

特表平6-506598

特 許 出 願 書 (第 1 号)

平成 11 年 4 月 5 日

発 明 者

1. 発明者の氏名

山本 隆雄 第 1 0 0 2 3 号

2. 発明をする者

発明者の氏名

氏 名 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケーストン  
ブルーストリート 65  
番 号 5 0 0 2 3 号 第 1 0 0 2 3 号

3. 代理人

氏 名 東京府文京区本郷4丁目5番12号  
〒113 0045 山本 隆雄  
氏 名 (〒113 0045) 山本 隆雄

4. 発明の名称

5. 発明の要旨

6. 発明の概要

(1) 特許請求の範囲の記載方法。  
(2) 請求の範囲の記載方法。

特 許 出 願 書

DNA配列決定のための方法とその装置

発 明 の 名 称

この発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。

発明の要旨

本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。

本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。

発 明 の 概 要

本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。

本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。

本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。本発明は、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。特に、DNA配列決定のための方法とその装置に関するものである。



## 特表平6-506598

例17はヒトの胎膜(AとC)及びその胎(AとD)のPTM/PTFP、Pレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

例18はヒトの胎膜(AとC)及びその胎(AとD)のPTM/PTFP、Pレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

例19はヒトの胎膜(A)とSODS(2連鎖)(B)から作られた複製DNA(1-34)(ACB)及びその胎(AとD)のPTM/PTFP、Pレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

例20はヒトの胎膜(A)とSODS(2連鎖)(B)から作られた複製DNA(1-34)(ACB)及びその胎(AとD)のPTM/PTFP、Pレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

例21はヒトの胎膜(A)とSODS(2連鎖)(B)から作られた複製DNA(1-34)(ACB)及びその胎(AとD)のPTM/PTFP、Pレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

## 図2

二重 (N1e<sup>+</sup>, Tye<sup>+</sup>)のPTM(1-34)及びPTM(1-36)、(N1e<sup>+</sup>, Tye<sup>+</sup>)のPTM(1-34)及びPTM(1-36)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

の方法を用い、トリブレン処理によって処理された。

## 実験例2

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

## 図3

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。

複製DNAのPTM/PTFPレモグロビン遺伝子座に存在しているCの3連鎖への<sup>133</sup>ラベル化PTM(1-34)(ACB)及び<sup>133</sup>ラベル化PTM/PTFP(1-36)(CとD)の塩基を示すグラフである。組合せのグラフには、PTM(1-34)(D)、PTM(1-36)(D)、PTM(1-36)(D)の塩基を示すグラフである。













## 特衰平 6-506598

山内氏はこれらの理由を以て、一かして低圧ブロー装置に設置設備を止め、このボスミローに使用する他のソフトウェアの増設と分割に用いることが出来てゐる。

## クニ・人々の歴史

[illegible]

ボロボロ

本館によれば、ホリワタス氏は、所一丁を占むにあつて、おきてゐるホリヤム、ジョー、及びヒトの別荘に約五万モンレツプアー、思ひにかゝる地の目が彼が買ひしとセブアーに上り、これら地をブアーをブアーと生じて復するのほに、四丁にたつた地に復館の方針により、あるいは、ここに建設されてゐる別館の1つの地を約一丁半ブアーとして、四丁半を占むとされてゐる。

を同定した。さらに、別甲収得するモノと見做す甲代領ホムモノ現在在在に  
付くべき金貨の若干は、T.H.セプターの筆名にあるいは所にも未だ判の範囲内に  
ある。

[illegible]

河内國心念のなすの星のセプター星に於て、これらに因らるるお汁では無い。こ  
 のセプターの星で、一光の距離から「ハーロー」星の距離（例えば、  
 Chou and Faerman, Ann. Rev. Astron. and  
 Sp. Phys., 1978）のものと水素の光の波長が一致する。星の光の波長が  
 あると定まればその中にもある。例えば、星の光の波長は、約1.5%の  
 波長の差がある。星の光の波長は、約1.5%の波長の差がある。星の光の波長は、  
 約1.5%の波長の差がある。星の光の波長は、約1.5%の波長の差がある。

特定のPTT用トイプーの例には、K15Bクロームの径を $\pm 0.005$ mmに公差するは下の $\pm 0.005$ mmに公差する(公差の一定化で示されてい)が、また、

● 2017年10月1日

BP-1: TMTTREREYFDBLQHYVYCG (组别号: 51)  
BP-2: YLYSGFTLPHXKQYKXKL (组别号: 61)  
BP-3: YFPLXVPIATYXVYLVYRG (组别号: 71)  
BP-4: YPATLANTGCWDLSSQHEKXJIOVP (组别号: 81)  
BP-5: YTYEYSGTILXUQIMHYFM (组别号: 91)  
BP-6: BDPVTKEXGIFLHRAQA (组别号: 10)

**探田内ドメイン:**

RP1-7: FFLHCTBNY (5484:11)  
 RP1-8: WKKY WUTTL (5484:12)  
 RP1-9: VLA TKLRPTNACGCGVHQYKLLK (5484:13)

ニホミの所はKennermanの所也 (Edwardsinology 上  
下: 1230, 1884) によつて企成され、HFLCによつて採取され、  
ボツハノミの所也

#### 4. 派別による支持

[illegible]

入される。導入された細胞の選択は、遺伝的に上質なレベルのG418 (Geneticin, G4180) を用いて行われる。

[illegible][illegible]

Р. 49 В: 2057, 1480; 65942.

本会館の附設セブツア一館は既に 以下の如き性質を帯びてゐる。附設内に居る者あり、それと離れ居る、此の若に近知を重きとて居りし、その外は、その一般の人に開放されてゐる。一般に開放して置くと、一般に開放に止まる。このよう無制限なれば附設セブツアをどう形勢行動のものと判定し、その自他、ある目的のためで用ゐられてゐると、あるいは、セブツアを自由開放の場から閉鎖し、閉鎖せられしものと判定する。

作中の主人公は銀狐に家着せしめる古代と近代を貫く異次元の存在として、ゴッ  
 フド断片に、完結して、銀の象徴とされることには断片ではない。これがゴッフル  
 であるから、あるいはゴッフルにせよせよとせよとせよ、またと見するは断片（断  
 片、シグナル・ポイント）を含まないから、否から、否、可成りである。  
 本家のゴッフル・ポイントでは地味から収束することが出来る。しかし、そうであるが、  
 断片に断片して、断片のゴッフル・ポイントと断片の断片から断片しき断片でない。  
 断片とされる可断片の断片はゴッフル・ポイントの断片断片は、断片は断片、断片の  
 断片断片。

1) 23に示されるようなラットの肝のPTHrPとPTHrP受容体の、  
 発現パターンが示され、75/100-102からなるPT-1と関係が。

2) 図3に示されるように、ストロークの倍のPTB/PTHとPレセプターで、枕骨ローダー駆動を指示した。アミノ酸の2倍の量を必要とする。2倍の量を必要とする。

3) 図3に示されるようなラット皮膚の浸透率はPTKノPTHとリソソゾ

4)  $PR = 1$  (100% 1981).

$$5) \text{ PR} = 2,1 \text{ (от } 2,3 \text{)}$$
[illegible][illegible][illegible]

ラウーの招致したPTIメンバー衆議院議員に立候補を促していた米国のC  
S事団を主としたローマナス(Chornes River Laboratories, Wilmington, MA)の施設内(PTI)に存在す  
マウスは、その上PTIは同様に他国政府に受け、彼らの施設内に、同様の  
(PTI)に存在する同様の施設内。このため、同様の施設内に存在し、

[illegible]

比價にシヤズレ。15.5

本誌の掲載してあるといは、ソフトウェアとは、専門的に深く考へていふことが必要の方法によって、ソフトウェアの機能を定意する方法、及びソフトウェアの機能を定意するに必要の、媒体や装置の条件に準拠することから成る。例えば、PDP11というアーキテクチャーの存在を以て例取れば、他の任意のハードウェアに移植して実行されてもよいから、我々が本誌で取り扱うべきソフトウェアは、図1に示すように、その機能を定意する図1の図1、図2、図3、図4、図5、図6、図7、図8、図9、図10、図11、図12、図13、図14、図15、図16、図17、図18、図19、図20、図21、図22、図23、図24、図25、図26、図27、図28、図29、図30、図31、図32、図33、図34、図35、図36、図37、図38、図39、図40、図41、図42、図43、図44、図45、図46、図47、図48、図49、図50、図51、図52、図53、図54、図55、図56、図57、図58、図59、図60、図61、図62、図63、図64、図65、図66、図67、図68、図69、図70、図71、図72、図73、図74、図75、図76、図77、図78、図79、図80、図81、図82、図83、図84、図85、図86、図87、図88、図89、図90、図91、図92、図93、図94、図95、図96、図97、図98、図99、図100、図101、図102、図103、図104、図105、図106、図107、図108、図109、図110、図111、図112、図113、図114、図115、図116、図117、図118、図119、図120、図121、図122、図123、図124、図125、図126、図127、図128、図129、図130、図131、図132、図133、図134、図135、図136、図137、図138、図139、図140、図141、図142、図143、図144、図145、図146、図147、図148、図149、図150、図151、図152、図153、図154、図155、図156、図157、図158、図159、図160、図161、図162、図163、図164、図165、図166、図167、図168、図169、図170、図171、図172、図173、図174、図175、図176、図177、図178、図179、図180、図181、図182、図183、図184、図185、図186、図187、図188、図189、図190、図191、図192、図193、図194、図195、図196、図197、図198、図199、図200、図201、図202、図203、図204、図205、図206、図207、図208、図209、図210、図211、図212、図213、図214、図215、図216、図217、図218、図219、図220、図221、図222、図223、図224、図225、図226、図227、図228、図229、図230、図231、図232、図233、図234、図235、図236、図237、図238、図239、図240、図241、図242、図243、図244、図245、図246、図247、図248、図249、図250、図251、図252、図253、図254、図255、図256、図257、図258、図259、図260、図261、図262、図263、図264、図265、図266、図267、図268、図269、図270、図271、図272、図273、図274、図275、図276、図277、図278、図279、図280、図281、図282、図283、図284、図285、図286、図287、図288、図289、図290、図291、図292、図293、図294、図295、図296、図297、図298、図299、図300、図301、図302、図303、図304、図305、図306、図307、図308、図309、図310、図311、図312、図313、図314、図315、図316、図317、図318、図319、図320、図321、図322、図323、図324、図325、図326、図327、図328、図329、図330、図331、図332、図333、図334、図335、図336、図337、図338、図339、図340、図341、図342、図343、図344、図345、図346、図347、図348、図349、図350、図351、図352、図353、図354、図355、図356、図357、図358、図359、図360、図361、図362、図363、図364、図365、図366、図367、図368、図369、図370、図371、図372、図373、図374、図375、図376、図377、図378、図379、図380、図381、図382、図383、図384、図385、図386、図387、図388、図389、図390、図391、図392、図393、図394、図395、図396、図397、図398、図399、図400、図401、図402、図403、図404、図405、図406、図407、図408、図409、図410、図411、図412、図413、図414、図415、図416、図417、図418、図419、図420、図421、図422、図423、図424、図425、図426、図427、図428、図429、図430、図431、図432、図433、図434、図435、図436、図437、図438、図439、図440、図441、図442、図443、図444、図445、図446、図447、図448、図449、図450、図451、図452、図453、図454、図455、図456、図457、図458、図459、図460、図461、図462、図463、図464、図465、図466、図467、図468、図469、図470、図471、図472、図473、図474、図475、図476、図477、図478、図479、図480、図481、図482、図483、図484、図485、図486、図487、図488、図489、図490、図491、図492、図493、図494、図495、図496、図497、図498、図499、図500、図501、図502、図503、図504、図505、図506、図507、図508、図509、図510、図511、図512、図513、図514、図515、図516、図517、図518、図519、図520、図521、図522、図523、図524、図525、図526、図527、図528、図529、図530、図531、図532、図533、図534、図535、図536、図537、図538、図539、図540、図541、図542、図543、図544、図545、図546、図547、図548、図549、図550、図551、図552、図553、図554、図555、図556、図557、図558、図559、図560、図561、図562、図563、図564、図565、図566、図567、図568、図569、図570、図571、図572、図573、図574、図575、図576、図577、図578、図579、図580、図581、図582、図583、図584、図585、図586、図587、図588、図589、図590、図591、図592、図593、図594、図595、図596、図597、図598、図599、図600、図601、図602、図603、図604、図605、図606、図607、図608、図609、図610、図611、図612、図613、図614、図615、図616、図617、図618、図619、図620、図621、図622、図623、図624、図625、図626、図627、図628、図629、図630、図631、図632、図633、図634、図635、図636、図637、図638、図639、図640、図641、図642、図643、図644、図645、図646、図647、図648、図649、図650、図651、図652、図653、図654、図655、図656、図657、図658、図659、図660、図661、図662、図663、図664、図665、図666、図667、図668、図669、図670、図671、図672、図673、図674、図675、図676、図677、図678、図679、図680、図681、図682、図683、図684、図685、図686、図687、図688、図689、図690、図691、図692、図693、図694、図695、図696、図697、図698、図699、図700、図701、図702、図703、図704、図705、図706、図707、図708、図709、図710、図711、図712、図713、図714、図715、図716、図717、図718、図719、図720、図721、図722、図723、図724、図725、図726、図727、図728、図729、図730、図731、図732、図733、図734、図735、図736、図737、図738、図739、図740、図741、図742、図743、図744、図745、図746、図747、図748、図749、図750、図751、図752、図753、図754、図755、図756、図757、図758、図759、図760、図761、図762、図763、図764、図765、図766、図767、図768、図769、図770、図771、図772、図773、図774、図775、図776、図777、図778、図779、図780、図781、図782、図783、図784、図785、図786、図787、図788、図789、図790、図791、図792、図793、図794、図795、図796、図797、図798、図799、図800、図801、図802、図803、図804、図805、図806、図807、図808、図809、図810、図811、図812、図813、図814、図815、図816、図817、図

「アーク・コリン」はアシエンバントで製造された。同社の「アスト」の建設もウサギに所  
内に注進する。建設費は、半世紀前よりは先米アノバントで、1月10日では  
91日である。

この値は、この方法で得た値が正しいと仮定して算出される。第一に、平均値は正しく

[illegible][illegible]

本邦政府のポリス・ブレード及び銃法ならびに連射を所望は、PT11砲台。故に  
シヤニスト同族あい、ア・ニスト同族陸軍に二して、ここに我が国のアッサイ  
国いてスローニングするにとりあふ。

一側をみると、図2の図に上のPTHLとブアーを結ぶところの塩基  
PTIHあるいはPTHRPとPTH $\gamma$ /PTH $\beta$ とアダーへの結合に示さ  
す右方についてスクリューをなす。大抵外面にPTHLとブアーを包  
囲する構造は、 $^{131}\text{I}$ -PTHも存在する $^{131}\text{I}$ -PTH $\beta$ もPTH $\gamma$ もい

[illegible][illegible]













## 特表平6-506598

16. 請求項15に記載されている 本発明DNAであって、前記 断片化配列が  
核酸ホモモノレシクエーター誘起子と互に互に作用することを含む 本発明DNA。

17. 請求項15に記載されている 本発明DNAであって、前記DNAが細胞内  
に存在していることを含む 本発明DNA。

18. 断片化配列がモノレシクエーターのDNAの一部である 本発明DNAであ  
って、前記一部が断片化することを含む 本発明DNA。

19. 請求項18に記載されている 本発明DNAであって、前記DNAがアン  
テナであることを含む 本発明DNA。

20. 断片化配列がモノレシクエーターをコードしている領域とDNA分岐の位置に  
よって生成される断片化配列がモノレシクエーター。

21. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
な領域を含む。

22. 請求項20に記載されているDNAの複製によって生成される断片化配列が  
モノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む。

23. 請求項20に記載されているDNAの複製によって生成される断片化配列が  
モノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む。

24. 請求項20に記載されているDNAの複製によって生成される断片化配列が  
モノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む。

25. 請求項20に記載されているDNAの複製によって生成される断片化配列が  
モノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む。

- (a) T N C T E R E V F D R L G H I V T V G (配列番号1)。
- (b) V L Y S G F Y L D C A B K L T R E E L (配列番号2)。
- (c) V Y D F L Y F L A T N Y V G I E V E G (配列番号3)。
- (d) Y R A T L A H T G C W I L S S Q H K K W I I Q V (配列番号4)。
- (e) F Y T E S S Q T L W Q I Q M H Y Z H (配列番号5)。
- (f) D O V F T K E S Q T F L I H K A Q A (配列番号6)。
- (g) P F E L H A Y R H Y (配列番号7)。
- (h) E K E V L G Q A T L (配列番号8)。
- (i) V L A T K L H E F N A C D C D T E E E V R K K L K (配列番号9)。

26.

(j) 断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む  
(k) 断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要となる領域を含む。

27. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

28. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

29. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

30. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

31. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

32. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

33. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

34. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

35. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

36. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

37. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

38. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

39. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

40. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

41. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

42. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

43. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

44. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

45. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

46. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

47. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

48. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

49. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

50. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

51. 請求項20に記載されている断片化配列がモノレシクエーターの複製に必要  
となる領域を含む。

## 特表平6-506598

37. 前項試験ホルモンのセプター部が長あるいはその一部が折れ曲がっているか、あるいは配列を六分の一程度歪ませる材料とするポリスチレンとトリスを要する。

38. 以下の方法から少なくとも一つの方法とする方法。

(a) ヒトとマウスとの間の血清試料を採取する第一の自然採取工程と、

(b) 前記第一の自然採取工程後、前記工程に追加されている追加工程の追加工程に付する追加工程と工程と、

(c) 前記追加工程が「追加」工程、前記工程から2回目的血液試料を採取する第二の自然採取工程と、

(d) 前記第一の自然採取工程における血清試料中のカルシウムレベルと前記第二の自然採取工程における血清試料中のカルシウムレベルと比較して、前記第一の自然採取工程における血清試料中のカルシウムレベルを高い場合に前記試験ホルモンの試験した結果であることと推定される結果を示す。

39. 請求項16記載の試験ホルモンのDNAであって、前記DNAの使用が前項試験ホルモンのセプター部をコードしていることを特徴とするDNA。

40. 請求項23に記載の前項試験ホルモンのセプター部であって、前記試験ホルモンのセプター部に付されることを特徴とする前項試験ホルモンのセプター部。

41. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、前記ポリペプチドに付されることを特徴とするポリペプチド。

42. 請求項23に記載されている試薬であって、前記試薬に付されることを特徴とする試薬。

43. 請求項23に記載されている試薬であって、

(a) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

44. 請求項23に記載されている試薬であって、

(a) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

45. 請求項23に記載されている前項試験ホルモンのセプター部であって、

(a) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

46. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、前項試験ホルモンのセプター部に付されることを特徴とするポリペプチド。

47. 請求項23に記載されている試薬であって、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

48. 請求項23に記載されている試薬であって、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(a) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(b) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(c) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(d) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

49. 請求項23に記載されている前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(a) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(b) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

(c) 前項試験ホルモンの試験した結果は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。

50. 請求項23に記載されている前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬又は、前項試験ホルモンのセプター部の特性を測定するための試薬である。



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>5</sup> :</b> C12P 21/06, C12N 5/00, 15/00 C07H 15/12, 17/00, C07K 3/00 A61K 35/14, 37/24, 37/36	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 92/17602</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 15 October 1992 (15.10.92)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US92/02821 <b>(22) International Filing Date:</b> 6 April 1992 (06.04.92)  <b>(30) Priority data:</b> 681,702                      5 April 1991 (05.04.91)                      US 864,475                      6 April 1992 (06.04.92)                      US  <b>(71) Applicant:</b> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS [US/US]; Thirteenth Street, Building 149, Suite 1101, Charlestown, MA 02129 (US).  <b>(72) Inventors:</b> SEGRE, Gino, V. ; 58 Sedgemoor Road, Wayland, MA 01778 (US). KRONENBERG, Henry, M. ; 48 Hastings Road, Belmont, MA 02178 (US). ABOUSAMRA, Abdul-Badi ; Four Colonial Way, Plainville, MA 02762 (US). JUPPNER, Harald ; Eight Harris Street, Boston, MA 02109 (US). POTTS, John, T., Jr. ; 129 Chestnut Street, West Newton, MA 02165 (US). SCHIPANI, Ernestina ; Four Longfellow Place, Apt. 1004, Boston, MA 02114 (US).		<b>(74) Agent:</b> CLARK, Paul, T.: Fish and Richardson, 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).  <b>(81) Designated States:</b> AT (European patent), BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), MC (European patent), NL (European patent), SE (European patent).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME  <b>(57) Abstract</b>  DNA encoding a parathyroid hormone receptor; production and isolation of recombinant and synthetic parathyroid hormone receptor polypeptides and fragments; antibodies to parathyroid hormone receptors and receptor fragments; methods for screening candidate compounds for antagonistic or agonistic effects on parathyroid hormone receptor action; and diagnostic and therapeutic methods of these compounds are disclosed.		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MN	Mongolia
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Netherlands
BJ	Benin	GR	Greece	NO	Norway
BR	Brazil	HU	Hungary	PL	Poland
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany	MC	Monaco	TC	Togo
DK	Denmark			US	United States of America



- 1 -

(A) **PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME**

Background of the Invention

Partial funding of the work described herein was provided by the U.S. Government, which has certain rights to the invention. (D)

The invention relates to endocrine receptors.

A crucial step in the expression of hormonal action is the interaction of hormones with receptors on the plasma membrane surface of target cells. The formation of hormone-receptor complexes allows the transduction of extracellular signals into the cell to elicit a variety of biological responses. For example, binding of a hormone such as follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH), and chorionic gonadotropin (CG), to its cell surface receptor induces a conformational change in the receptor, resulting in the association of the receptor with a transducer molecule, the stimulatory guanine nucleotide (GTP) binding protein, a component of which is ( $G_s$ ). This association stimulates adenylate cyclase activity which in turn triggers other cellular processes such as protein phosphorylation, steroid synthesis and secretion, and the modulation of ion flux. Binding of other hormones, including arginine vasopressin (VP), angiotensin II, and norepinephrine, to their cell surface receptors results in the activation of other types of GTP binding proteins components such as ( $G_p$ ), which in turn stimulates the activity of the enzyme phospholipase C. The products of phospholipase C hydrolysis initiate a complex cascade of cellular events, including the mobilization of intracellular calcium and protein phosphorylation. (2)

Parathyroid hormone (PTH) is a major regulator of calcium homeostasis whose principal target cells occur in

- 2 -

bone and kidney. Regulation of calcium concentration is necessary for the normal function of the gastrointestinal, skeletal, neurologic, neuromuscular, and cardiovascular systems. PTH synthesis and release are controlled principally by the serum calcium level: a low level stimulates and a high level suppresses both the hormone synthesis and release. PTH, in turn, maintains the serum calcium level by directly or indirectly promoting calcium entry into the blood at three sites of calcium exchange: gut, bone and kidney. PTH contributes to net gastrointestinal absorption of calcium by favoring the renal synthesis of the active form of vitamin D. PTH promotes calcium resorption from bone by inhibiting osteoblasts and, indirectly, by stimulating differentiation of the bone-resorbing cells, osteoclasts. It also mediates at least three main effects on the kidney: stimulation of tubular calcium reabsorption, enhancement of phosphate clearance, and promotion of an increase in the enzyme that completes synthesis of the active form of vitamin D. PTH exerts these effects primarily through receptor-mediated activation of adenylate cyclase, although receptor-mediated activation of phospholipase C by PTH has also been reported (Hruska et al., J. Clin. Invest. 79:230, 1987).

Disruption of calcium homeostasis may produce many clinical disorders (e.g., severe bone disease, anemia, renal impairment, ulcers, myopathy, and neuropathy) and usually results from conditions which produce an alteration in the level of parathyroid hormone.

Hypercalcemia is a condition which is characterized by an elevation in the serum calcium level. It is often associated with primary hyperparathyroidism in which an excess of PTH production occurs as a result of a lesion (e.g., adenoma, hyperplasia or carcinoma) of the parathyroid glands. Another type of hypercalcemia,

- 3 -

humoral hypercalcemia of malignancy (HHM), is the most common paraneoplastic syndrome. It appears to result in most instances from the production by tumors (e.g., squamous, renal, ovarian or bladder carcinomas) of a novel class of protein hormone which shares amino acid homology with PTH. These PTH-related proteins (PTHrP) appear to mimic certain of the renal and skeletal actions of PTH and are believed to interact with the PTH receptor in these tissues. PTHrP is normally found at low levels in many tissues, including keratinocytes, brain, pituitary, parathyroid, adrenal cortex, medulla, fetal liver, osteoblast-like cells and lactating mammary tissues. In many HHM malignancies, PTHrP is found in the circulatory system at high levels, thereby producing the elevated calcium levels associated with HHM.

#### Summary of the Invention

The invention features isolated DNA comprising a DNA sequence encoding a cell receptor, preferably a parathyroid hormone receptor, of a vertebrate animal, which receptor has an amino acid sequence with at least 30% (preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and most preferably at least 75%) identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3 (SEQ ID NO.: 3): i.e., when the closest match is made between the two amino acid sequences (using standard methods), at least 30% of the amino acid residues of the former sequence are identical to the amino acid residues of the latter sequence. By "isolated" is meant that the DNA is free of the coding sequences of those genes that, in the naturally-occurring genome of the organism (if any) from which the DNA of the invention is derived, immediately flank the gene encoding the DNA of the invention. The isolated DNA may be single-stranded or double-stranded, and may be genomic DNA, cDNA, recombinant hybrid DNA, or

- 4 -

synthetic DNA. It may be identical to a naturally-occurring, cell receptor- (e.g. PTH receptor) encoding DNA sequence, or may differ from such sequence by the deletion, addition, or substitution of one or more

5 nucleotides. Single-stranded DNAs of the invention are generally at least 8 nucleotides long, (preferably at least 18 nucleotides long, and more preferably at least 30 nucleotides long) ranging up to full length of the gene or cDNA; they preferably are detectably labelled for

10 use as hybridization probes, and may be antisense. Preferably, the isolated DNA hybridizes under conditions of high stringency to all or part of the DNA sequence show in FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2), FIG. 3 (SEQ ID NO.:3), or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4). By

15 "high stringency" is meant, for example, conditions such as those described herein below for the isolation of human kidney PTH receptor cDNA (also see Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, hereby incorporated by reference). Most

20 preferably, the animal is a mammal (such as an opossum, a rat, or a human), and the DNA sequence encodes substantially all of the amino acid sequence shown in FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2), FIG. 3 (SEQ ID NO.:3) or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4); or is encoded by the

25 coding sequence of one of the plasmids deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) and designated ATCC Accession No. 68570 or 68571. The DNA of the invention may be incorporated into a vector [which may be provided as a purified preparation (e.g., a vector

30 separated from the mixture of vectors which make up a library)] containing a DNA sequence encoding a cell receptor of the invention (e.g. parathyroid hormone receptor) or fragment of the receptor, and a cell or essentially homogenous population of cells (e.g.,

35 prokaryotic cells, or eukaryotic cells such as mammalian

- 5 -

cells) which contain the vector (or the isolated DNA described above). By "essentially homogenous" is meant that at least 99% of the cells contain the vector of the invention (or the isolated DNA, as the case may be).

5 Preferably, this vector (e.g., R15B) is capable of directing expression of a parathyroid hormone receptor (for example, in a cell transfected or transformed with the vector).

10 In another aspect, the invention features a cell receptor, preferably parathyroid hormone receptor, (or an essentially purified preparation thereof) produced by expression of a recombinant DNA molecule encoding the cell receptor. An "essentially purified preparation" is one which is substantially free of the proteins and  
15 lipids with which it is naturally associated.

20 In a related aspect, the invention features a polypeptide which includes a fragment of a naturally-occurring cell receptor of the invention. Preferably, the polypeptide includes a fragment of a naturally-occurring parathyroid hormone receptor which is capable of binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein. In preferred embodiments, this fragment is at least six amino acids long, and has a sequence selected from the group including:

- 25 (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG; (SEQ ID NO.: 5)  
(b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL; (SEQ ID NO.: 6)  
(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG; (SEQ ID NO.: 7)  
(d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP; (SEQ. ID NO.: 8)  
(e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM; (SEQ ID NO.: 9)  
30 (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA; (SEQ ID NO.: 10)  
(g) FFRLHCTRNY; (SEQ ID NO.: 11)  
(h) EKKYLWGFTL; (SEQ ID NO.: 12)  
(i) VLATKLRETNAGRCDTRQQYRKLK; or (SEQ ID NO. 13)  
(j) a fragment (i.e., a portion at least six  
35 residues long, but less than all) or analog of (a) - (i)

- 6 -

7  
which is capable of binding parathyroid hormone or  
parathyroid hormone-related protein [wherein "analog"  
denotes a peptide having a sequence at least 50% (and  
preferably at least 70%) identical to the peptide of  
5 which it is an analog]. Preferably, the polypeptide of  
the invention is produced by expression of a recombinant  
DNA molecule or is synthetic (i.e., assembled by chemical  
rather than biological means). The invention provides a  
method for producing such a polypeptide, which method  
10 includes providing a cell containing isolated DNA  
encoding a cell receptor of the invention or receptor  
fragment and culturing this cell under conditions which  
permit expression of a polypeptide from the isolated DNA.

8  
The invention also features an antibody  
15 (monoclonal or polyclonal), and a purified preparation of  
an antibody, which is capable of forming an immune  
complex with a cell receptor of the invention (preferably  
a parathyroid hormone receptor such as a human PTH  
receptor) such antibody being generated by using as  
20 antigen either (1) a polypeptide that includes a fragment  
of the cell receptor of the invention, or (2) a cell  
receptor of the invention which is on the surface of a  
cell. This antibody is preferably capable of  
neutralizing (i.e., partially or completely inhibiting) a  
25 biological activity of the cell receptor of the invention  
(i.e., a component of one of the cascades naturally  
triggered by the receptor when its ligand binds to it).  
In preferred embodiments, the antibody of the invention  
is capable of forming an immune complex with parathyroid  
30 hormone receptor and is capable of neutralizing a  
biological activity of the PTH receptor (i.e. adenylate  
cyclase activation or phospholipase C stimulation)

9  
Also within the invention is a therapeutic  
composition including, in a pharmaceutically-acceptable  
35 carrier, (a) a cell receptor of the invention, (b) a

- 7 -

9 polypeptide containing a fragment of the cell receptor of the invention, or (c) an antibody to a cell receptor of the invention. These therapeutic compositions provide a means for treating various disorders characterized by  
5 overstimulation of the cell receptors of the invention by their ligand. In preferred embodiments, the polypeptides of the invention include the PTH receptor, fragments of the PTH receptor and antibodies which form immune  
10 complexes with the PTH receptor. These polypeptides and antibodies are useful as diagnostics, for distinguishing those cases of hypercalcemia related to PTH or PTHrP from those which are not.

15 The nucleic acid probes of the invention enable one of ordinary skill in the art of genetic engineering to identify and clone cell receptor homologs or cell receptors from any species which are related to the cell receptors of the invention, expanding the usefulness of the sequences of the invention.

20 Other features and advantages of the invention will be apparent from the following description of the preferred embodiments and from the claims.

#### Detailed Description

The drawings will first be briefly described.

#### DRAWINGS

25 FIG. 1 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP receptor clone, OK-H. (SEQ ID NO.: 1)

30 FIG. 2 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP receptor clone, OK-O. (SEQ ID NO.: 2)

FIG. 3 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the rat bone PTH/PTHrP receptor clone, R15B. (SEQ ID NO.: 3)

- 8 -

FIG. 4 is a comparison of the deduced amino acid sequences encoded by cDNAs from clones OK-O and R15B.

FIG. 5 is a comparison of the deduced amino acid sequences of OK-O, OK-H and R15B, lined up according to sequence homology.

FIG. 6 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the human PTH/PTHrP receptor. (SEQ ID NO.: 4)

FIG. 7 is a schematic representation of the rat bone PTH/PTHrP receptor cDNA, the human genomic DNA clone HPG1 and two cDNA clones encoding the human PTH/PTHrP receptor.

FIG. 8 is a hydrophobicity plot of the deduced amino acid sequence of the human kidney PTH/PTHrP receptor. Predicted membrane-spanning domains I through VII are indicated; A, B and C indicate additional hydrophobic regions.

FIG. 9 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-H.

FIG. 10 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-H.

FIG. 11 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-O.

FIG. 12 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-O.

FIG. 13 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with R15B.

FIG. 14 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with R15B.

FIG. 15 is a graph illustrating stimulation of inositol phosphate metabolism by NlePTH in COS cells transfected with OK-H, OK-O, or R15B.



- 9 -

FIG. 16 is a graph illustrating cyclic AMP accumulation in COS cells transfected with CDM-8, OK-H, R15B by NlePTH.

FIG. 17 are graphs illustrating binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH(1-34) (A and B) and  $^{125}\text{I}$ -labelled PTHrP(1-36) (C and D) to COS-7 cells transiently expressing the human kidney (A and C) and the rat bone (B and D) PTH/PTHrP receptor; competing ligands included PTH(1-34) ( $\square$ ), PTHrP(1-36) (\*), PTH(3-34) ( $\blacksquare$ ), PTH(7-34) (+). Data are given as % specific binding and represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments.

FIG. 18 is a bar graph illustrating stimulated accumulation of intracellular cAMP in COS-7 cells transiently expressing the human kidney receptor. Data show the mean  $\pm$  SD, and are representative of at least three independent experiments.

FIG. 19 represents a Northern blot analysis of total RNA ( $\sim 10 \mu\text{g}/\text{lane}$ ) prepared from human kidney (A) and SaOS-2 cells (B). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor; positions of 28S and 18S ribosomal RNA bands are indicated.

FIG. 20 represents a Southern blot analysis of human genomic DNA digested with SstI, HindIII, and XhoI ( $\sim 10 \mu\text{g}/\text{lane}$ ). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor.

FIG. 21 is a schematic diagram of the proposed arrangement, in a cellular membrane, of PTH/PTHrP rat bone receptor encoded by R15B.

30

#### MATERIALS AND METHODS

GENERAL: [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(1-34)amide (PTH(1-34)), [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(3-34)amide (PTH(3-34)), and [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(7-34)amide (PTH(7-34)) were obtained from Bachem Fine Chemicals, Torrance, CA; [Tyr<sup>36</sup>]PTHrP(1-

- 10 -

36)amide (PTHrP(1-36)) was synthesized as described (Keutman et al., Endocrinology 117:1230, 1985) using an Applied Biosystems Synthesizer 420A. Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), EDTA/trypsin, and gentamycin were 5 from GIBCO (Grand Island, NY); fetal bovine serum (FBS) was from Hiclon Laboratory, Logan, UT. Total RNA from human kidney was provided by Per Hellman, University Hospital, Uppsala, Sweden. Oligonucleotide primers were synthesized using an Applied Biosystems 380B DNA 10 Synthesizer. Restriction enzymes, Klenow enzyme, T4 polynucleotide Kinase and T4 DNA ligase were from New England Biolabs, Beverly, MA. Calf alkaline phosphatase was from Boehringer Mannheim, Germany. All other reagents were of highest purity available.

15 CELLS

Cell lines used include COS cells, OK cells, SaOS-2 cells, CHO cells, AtT20 cells, LLC-PK1 cells, and UMR-106 cells, which are available from a variety of sources including the American Type Culture Collection (Rockland, 20 Maryland), Accession Nos. CRL1650, CRL6551, HTB85, CCL61, CCL89, CL101, and CRL1161, respectively. ROS 17/2 and ROS 17/2.8 are available from a number of sources including Dr. Gideon Rodan (Merck Laboratories, West Point, PA). MC-3T3 cells are derived from mouse bone 25 cells and are also available from a number of sources including Dr. Chohei Shigeno (Dept. of Biochem. Medicine, Hyoto Univ., Kyoto, Japan).

All cells were grown in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and maintained in monolayer culture with 30 Ham's F-12 or DMEM medium (Grand Island Biological Co.), supplemented with 5% or 10% fetal calf serum (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD). The medium was changed every 3 or 4 days, and the cells were subcultured every 2 35 or 3 weeks by

- 11 -

trypsinization using standard methods.

### CLONING

Isolation of cDNA clones encoding the rat and opossum PTH/PTHrP receptors: Total RNA was initially  
5 isolated from rat osteosarcoma (ROS) cells (ROS 17/2.8) and opossum kidney (OK) cells, by standard methods using guanidium isothiocyanate (Ullrich et al., Science 196: 1313, 1977; Chirgwin et al. Biochemistry 24: 5294, 1979), and centrifugation through cesium chloride (Gilsen et  
10 al., Biochemistry 13: 2633, 1974). Poly A+ RNAs (mRNAs) were then recovered after passage of the total RNAs over oligo dT columns (Pharmacia, Piscataway, NJ) by the method of Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad Sci. USA 69: 14087, 1972). The cDNA library from the ROS 17/2.8 mRNA  
15 was prepared from poly A+ RNA using the method of Gubler and Hoffman (Gene (Amst.) 25: 263, 1983). Oligo dT-primed and random-primed cDNAs were synthesized from poly A+ ROS 17/2.8 and OK cell mRNA, respectively (Aviv and Leder, supra). The cDNAs were ligated to BstX1 linkers  
20 (Invitrogen, San Diego, CA) and size-selected by centrifugation (3 h, 55,000 xg) in a 5-20% potassium acetate gradient. The size-selected cDNA was then inserted into the plasmid vector, pcDNA I (Invitrogen), using the non-self annealing BstX1 restriction sites.  
25 The resultant plasmid libraries were then used to transform E. coli (MC1061/P3, Invitrogen) containing a larger helper plasmid, p3. The p3 plasmid possesses amber mutations in two genes which code for ampicillin and  
30 tetracycline resistance. Using ampicillin and tetracycline selection, only those cells containing both the p3 and a tRNA suppressor gene, which is contained within pcDNA I, were capable of growth. The transformed bacteria were then grown to confluence, and the plasmid  
35 DNAs isolated using standard techniques (e.g., see

- 12 -

(13) Ausebel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989). These DNAs were then taken up in a DEAE-dextran solution, and used to transfect African Green Monkey kidney (COS) cells, which  
5 had been grown to 75% confluence in "sideflasks" (Nunc, Denmark).

Screening for COS cells containing plasmids capable of expressing functionally-intact ROS or OK cell parathyroid hormone/parathyroid hormone related-protein  
10 (PTH/PTHrP) receptor proteins was performed according to Gearing et al. (EMBO J. 8: 3676, 1989), with some minor modifications including DEAE-Dextran transfection in sideflasks. Forty-eight hours after transfection, the cells were tested for binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled  $[\text{Tyr}^{36}]\text{PTHrp}$   
15 (1-36) amide, using methods previously described (Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1208, 1988), with the following exceptions: the time and temperature of the incubation were 2h and room temperature, respectively. After rinsing, the cells were fixed with 1.25%  
20 glutaraldehyde, and rinsed with 1% gelatin. After snapping off the top of the sideflask, the remaining microscope slide was dipped into NTB-2 photographic emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY). After 3-4 days of exposure at 4°C, the slides were developed, fixed, and  
25 stained with 0.03% toluidine blue. Screening of each slide was performed under a light microscope (Olympus). One pool of plasmid-DNA from ROS cells, and two pools of plasmid-DNA from OK cells, (10,000 independent clones), each gave rise to 3-4 transfected COS cells expressing  
30 the PTH/PTHrP receptor. These pools were subsequently subdivided. The subpools were used to transfect COS cells, and single clones were identified that expressed receptor protein capable of binding the radioligand.

(14) Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding  
35 the human PTH/PTHrP receptor: A human kidney oligo dT-

- 13 -

primed cDNA library ( $1.7 \times 10^6$  independent clones) in  
lambda GT10 and a genomic library of human placental DNA  
( $2.5 \times 10^6$  independent clones) in EMBL3 (Sp6/T7) (Clontech,  
Palo Alto, CA) were screened by the plaque hybridization  
5 technique (Sambrook et al., Molecular Cloning: A  
Laboratory Manual, 2nd Ed. pp. 108-113, Cold Spring  
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) with the  
 $^{32}\text{P}$ -labelled (random primed labelling kit Boehringer  
Mannheim, Germany) BamHI/NotI 1.8kb restriction enzyme  
10 fragment encoding most of the coding sequence of the rat  
bone PTH/PTHrp receptor (Fig. 3). The nitrocellulose  
filters were incubated at  $42^\circ\text{C}$  for 4 hrs in a  
prehybridization solution containing 50% formamide, 4x  
saline sodium citrate (SSC;  $1 \times \text{SSC}$ : 300 mM NaCl, 30 mM  
15 NaCitrate, pH 7.0), 2x Denhardt's solution,  
10% Dextran sulphate, 100  $\mu\text{g/ml}$  salmon sperm DNA (final  
concentration). The hybridizations were carried out in  
the same solution at  $42^\circ\text{C}$  for 18-24h. Filters were  
washed with 2x SSC/0.1% SDS for 30 minutes at room  
20 temperature and then with  $1 \times \text{SSC}$ /0.1% SDS for 30 minutes  
at  $45^\circ\text{C}$ . The films were exposed at  $-80^\circ\text{C}$  for 18-24h using  
intensifying screens.

About 1,000,000 clones were screened from each  
library. Positive clones were plaque-purified and lambda  
25 phage DNA was isolated (Sambrook et al., supra). Cloned  
inserts were removed from phage DNA by digestion with  
restriction endonucleases HindIII and EcoRI (lambda GT10  
library), or with XhoI and SstI (EMBL3 library), and were  
then subcloned into pcDNAI (Invitrogen, San Diego, CA)  
30 using the appropriate, dephosphorylated restriction  
sites. Sequencing of the  $\text{CsCl}_2$ -purified subclones was  
performed according to Sanger et al. (Biochem 74:5463,  
1977) by the dideoxy termination method (Sequenase  
version 2 sequencing kit, United States Biochemical  
35 Corporation, Cleveland, OH).

- 14 -

Reverse transcription and polymerase chain

17  
reaction (PCR): 3 µg of poly (A)+ RNA from human kidney (Clontech, Palo Alto, CA) in 73.5 µl of H<sub>2</sub>O was incubated at 100°C for 30 seconds, quenched on ice, and then added to 20 µl of 5x RT buffer (1x RT buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 8.2, 40 mM KCl, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, and dNTPs at 0.5 mM each), 2 µl (4 units) RNasin (Promega Biotec, Madison, WI), 1 µl (80 pmol/µl) of the human cDNA primer H12

10 (5'-AGATGAGGCTGTGCAGGT-3'; SEQ ID NO.: 14) and 80 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Life Sciences, St. Petersburg, FL). The reaction mixture was incubated for 40 minutes at 42°C. One-tenth of the first strand synthesis reaction mixture was then amplified by  
15 PCR in a final volume of 100 µl containing 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM dNTPs, 2 units of Vent polymerase (New England Biolab, Beverly, MA), and 2 µM each of the forward and the reverse primers (PCR conditions: denaturing for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, and extension at  
20 72°C for 3 minutes; 40 cycles).

Two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) degenerate primer RK-1 (5'-GGAATTCCATGGGAGCGGCCCGGAT-3'; SEQ ID NO.: 15) based on

25 G CC  
the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors (described above), and ii) primer RK-2 (5'-CGGGATCCCGCGGCCCTAGGCGGT-3'; SEQ ID NO.: 16) based on the 5' untranslated region of the human genomic clone  
30 HPG1. Both PCR reactions used the reverse primer H26 (5'-AGTATAGCGTCCTTGACGA-3'; SEQ ID NO.: 17) representing nucleotides 713 to 731 of the coding region of the human PTH/PTHrP receptor (Fig. 4). PCR products were blunt-ended using Klenow enzyme and cloned into  
35 dephosphorylated pCDNAI cut with EcoRV.

- 15 -

18  
5 Northern blot analysis: Total RNA was extracted from SaOS-2 cells and from human kidney by the guanidine thiocyanate method (Chirgwin et al., Biochem. 18:5294, 1979). For Northern blot analysis, ~10 µg of total RNA was subjected to electrophoresis on a 1.5%/37% formaldehyde gel and blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see above). The filters were washed at a final stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 60°C and exposed for autoradiography.

15 Southern blot analysis: Human genomic DNA was prepared using the SDS/proteinase K method (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36:32, 1973). For Southern analysis, ~10 µg of DNA was digested with SstI, PvuII and XhoI; subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel; and blotted onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see above). The filters were washed at a final stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 55°C and exposed for autoradiography.

#### FUNCTIONAL ASSAYS

19  
25 Tests to characterize the functional properties of the cloned receptors expressed on COS cells included:

I) binding of PTH and PTHrP fragments and analogues, II) stimulation of cyclic AMP accumulation by PTH and PTHrP fragments and analogues,

30 III) increase of intracellular free calcium by PTH and PTHrP fragments and analogues, and

IV) activation of inositol phosphate metabolism by PTH and PTHrP fragments and analogues. The methodologies are as follows:

- 16 -

Radioreceptor Assay

20  
[Nle<sup>8</sup>, Nle<sup>18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH-(1-34)amide (NlePTH), and  
[Tyr<sup>36</sup>]PTHrP(1-36)amide(PTHrP) were iodinated with Na<sup>125</sup>I  
(carrier free, New England Nuclear, Boston, MA) as  
5 previously reported (Segre et al., J. Biol. Chem. 254:  
6980, 1979), and purified by reverse-phase HPLC. In  
brief, the labeled peptide was dissolved in 0.1%  
trifluoroacetic acid (TFA), applied to a C<sub>18</sub> Sep-pak  
cartridge (Waters Associates, Inc., Milford, MA) and  
10 eluted with a solution of 60% acetonitrile in 0.1% TFA.  
After lyophilization, the radioligand then was applied to  
C<sub>18</sub>-μBondapak column (3.9 mm x 30 cm. Waters Associates)  
and eluted over 30 min with a linear gradient of 30-50%  
acetonitrile-0.1% TFA at a flow rate of 2 ml/min. The  
15 radioligand eluted in two peaks; the first peak, which  
eluted at approximately 38% acetonitrile, was used in  
these studies because it gave higher total and specific  
bindings. The specific activity was 500 ± 75 mCi/mg,  
which corresponds to an average iodine-peptide ratio of  
20 1.

COS-7 cells were grown in 15 cm plates in DMEM,  
10% heat-inactivated FBS, 10 mg/L gentamycin until 80-  
90% confluent. Twenty-four hours after transfection by  
the  
25 DEAE/Dextran method (Sambrook et al., *supra*), with 1-2 μg  
of plasmid DNA, the cells were trypsinized and replated  
in multiwell plastic dishes (16 or 35 mm diameter,  
Costar, Cambridge, MA) at a cell concentration of 5 x 10<sup>4</sup>  
cells/cm<sup>2</sup>). Cell number increased only slightly after  
30 transfection. After continuing culture for another 48 h,  
radioreceptor assays were performed. The culture medium  
was replaced with buffer containing 50 mM Tris-HCL (pH  
7.7),  
100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCL, 0.5% heat-inactivated  
35 fetal bovine serum (GIBCO), and 5% heat-inactivated horse



- 17 -

20 serum (KC Biological Inc., Lenexa, KS) immediately before studies were initiated. Unless otherwise indicated, studies were conducted with cells incubated in this buffer at 15°C for 4 h with  $4 \times 10^5$  cpm/ml ( $9.6 \times 10^{-11}$  M) of  $^{125}\text{I}$ -labeled NlePTH or PTHrP.

21 Incubations were terminated by aspirating the buffer, and repeatedly (x3) washing the culture dishes containing the adherent cells with chilled 0.9% NaCl solution, over a 15 sec period. Cell-bound radioactivity was recovered by the sequential addition (x3) of 1 N NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) to each well. After 30 min at room temperature, the NaOH was transferred to a glass tube. A second and third extraction with 1 N NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) were combined with the first, and the total radioactivity was counted in a  $\gamma$ -spectrometer (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Tracer adherence to culture vessel without cells was negligible (<0.2% of total counts added), if vessels were preincubated with culture medium.

22 Determinations of cAMP accumulation

20 Intracellular cAMP accumulation was measured as described previously (Abou-Samra et al., J. Biol. Chem. 262:1129, 1986). Cells in 24-well plates were rinsed with culture medium containing 0.1% BSA and 2mM IBMX. The cells were then incubated with PTH or PTHrP for 15 min. at 37° C. The supernatant was removed and the cells immediately frozen by placing the whole plate in dry ice powder. Intracellular cAMP was extracted by thawing the cells in 1ml of 50 mM HCl and analyzed by a specific radioimmunoassay using an anti-cAMP antibody (e.g., Sigma, St. Louis, MO). A cAMP analog (2'-O-monosuccinyl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate tyrosyl methyl ester, obtained from Sigma) which was used a tracer for cAMP was iodinated by the chloramine T method. Free iodine was removed by adsorbing the iodinated cAMP analog onto a C18 Sep-pak cartridge (Waters, Milford, MA).

- 18 -

After washing with  $\text{dH}_2\text{O}$ , the iodinated CAMP analog was eluted from the Sep-pak Cartridge with 40% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The iodinated CAMP analog was lyophilized, reconstituted in 1 ml 0.1% TFA, and injected into a C18 reverse phase HPLC column (Waters). The column was equilibrated with 10% ACN in 0.1% TFA, and eluted with gradient of 10-30% ACN in 0.1% TFA. This allows separation of the mono-iodinated CAMP analog from the non-iodinated CAMP analog. The tracer is stable for up to 4 months when stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The standard used for the assay, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, was purchased from Sigma. Samples (1-10  $\mu\text{l}$  of HCl extracts) or standards (0.04-100 fmol/tube) were diluted in 50 mM Na-acetate (pH 5.5), and acetylated with 10  $\mu\text{l}$  of mixture of triethylamine and acetic anhydride (2:1 vol:vol). After acetylation, CAMP antiserum (100  $\mu\text{l}$ ) was added from a stock solution (1:4000) made in PBS (pH 7.4), 5 mM EDTA and 1% normal rabbit serum. The tracer was diluted in PBS (pH 7.4) with 0.1% BSA, and added (20,000 cpm/tube). The assay was incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight. The bound tracer was precipitated by adding 100  $\mu\text{l}$  of goat anti-rabbit antiserum (1:20 in PBS) and 1 ml of 7% polyethyleneglycol (MW 5000-6000), centrifuging at 2000 rpm for 30 min. at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was removed and the bound radioactivity was counted in a  $\gamma$ -counter (Micromedic). Standard curves were calculated using the four-parameter RIA program supplied by Micromedic. Typically, the assay sensitivity is 0.1 fmol/ tube, and the standard concentration that displaces 50% of tracer is 5 fmol/tube.

In an alternative method for assaying CAMP accumulation, COS cells transfected with PTH/PTHrP receptor cDNA are harvested with a plastic policeman into a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM

- 19 -

23  
MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ethyleneglycolbis( $\beta$ -amino ethyl ether) *N,N'*-tetra-acetic acid (EGTA) (Sigma) and 1 mM dithiothreitol (Sigma). Cells are homogenated by 20 strokes of tightly-fitting Dounce homogenizer, and centrifuged at 13,000 x g  
5 for 15 min at 4°C (Eppendorf, type 5412, Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, NY). The pellet containing the plasma membranes is resuspended in the same buffer by several strokes with a Dounce homogenizer, and further diluted with the same buffer to a protein concentration  
10 of approximately 1.2 mg/ml, as determined by the method of Lowry et al. (Lowry et al., J. Biol. Chem 193: 265, 1951). Approximately 30  $\mu$ g (25  $\mu$ l) membrane are incubated with varying concentrations of hormone or vehicle alone for 10 min at 37°C (final volume, 100  $\mu$ l)  
15 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.8 mM ATP, 4 x 10<sup>6</sup> cpm [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA), 9 mM theophylline, 4.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM KCl, 0.12% BSA, and an ATP-regenerating system containing 5 mM creatine phosphate (Schwartz/Mann Division, Becton-Dickenson &  
20 Co., Orangeburg, NY) and 0.1 mg/ml creatine phosphokinase (Shwartz/Mann). Incubations are initiated by addition of the membrane suspension and terminated by addition of 100  $\mu$ l of a solution containing 20 mM cAMP, approximately 50,000 cpm [<sup>3</sup>H]cAMP, and 80 mM ATP. The reaction mixture  
25 is boiled, and the [<sup>32</sup>P]cAMP generated is purified by sequential chromatography on ion-exchange columns (Dowex 50 W-X4, Biorad Lab, Richmond, CA) and alumina (Sigma). The [<sup>32</sup>P]cAMP may be counted in a  $\beta$ -scintillation counter (Packard Instrument Co.), with correction for recovery of  
30 [<sup>3</sup>H]cAMP.

#### Determination of intracellular free calcium

24  
Measurements of intracellular calcium levels in cells transfected with PTH/PTHrP receptor cDNAs were performed using Fura-2 AM (acetomethoxy ester of Fura-2,

- 20 -

Molecular Probes Inc., Eugene, OR) loaded cells. Details of the methodology are:

Coverslips plated with COS cells were incubated in Fura-2 AM loading buffer containing, in mM: HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), 20;  $\text{CaCl}_2$ , 1; KCl 5; NaCl, 145;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.4; glucose, 10; and Fura-2 AM 91-(2-5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxo-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetomethoxy ester), 0.5; at 37°C at pH7.4, aerated with 95% air and 5%  $\text{CO}_2$  for 45 minutes. Cells loaded with Fura-2 AM were then washed with a modified Krebs-Heinseleit (KH) buffer containing, in mM: HEPES, 20;  $\text{CaCl}_2$ , 1; KCl, 5; NaCl, 145;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1; glucose, 5; pH7.4. To check that cleavage of the ester occurred, the excitation spectra after different times of Fura-2 AM incubation were measured. At 5 min. after the start of incubation, the excitation spectrum peaked at approximately 360 nm, reflecting incomplete hydrolysis of Fura-2 AM, whereas beyond 30 min. the excitation spectrum peaked at 345 nm, characteristic of Fura-2.

To measure fluorescence of individual cells, the cover slips were placed in a microscope tissue chamber (Biophysica Technologies, Inc., MD). The chamber consisted of a shallow, sloped compartment made of Teflon with a silicone rubber seal. The cover slips served as the bottom of the chamber. A heater/cooler ring was encased in the silicone rubber which sealed the coverslip in place. Temperatures were varied between 22°C and 37°C by applying 0-7.4 V to the heater. If the temperature is not specifically stated, the experiment was performed at 37°C. The chamber was mounted on the stage of an inverted microscope (Zeiss IM-35, Thornwood, NY). Fura-2 fluorescence was excited with a 75 watt Xenon arc lamp placed at the focal point of a condenser (Photon

- 21 -

Technologies International (PTI) Inc., NJ). Grating monochromators, alternated by a rotating chopper in which mirror vanes alternate with transmitting sectors, were used for selecting wavelengths. The monochromator outputs were combined to form a common optical path which exited the source housing through an adjustable iris. The light then passed through quartz lenses and a dichroic mirror through a 100x Nikon Fluor objective. A photon-counting PMT device detection was used to measure the light output. Data analysis was performed using PTI software run on an IBM-compatible AT/286 computer using the MS-DOS operating system. Data was retained and manipulated in a packed binary format.

Intracellular calcium concentrations were calculated according to the formula:  $[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)B$ , where R is the ratio of fluorescence of the cell at 340 and 380 nm; R<sub>max</sub> and R<sub>min</sub> represent the ratios of Fura-2 fluorescence intensity at 340 and 380 nm excitation wavelengths in the presence of a saturating amount of calcium and effectively zero calcium, respectively; B is the ratio of fluorescence of Fura-2 at 380 nm in zero calcium to that in saturating amounts of calcium; and K<sub>d</sub> is the dissociation constant of Fura-2 for calcium. To determine R<sub>max</sub>, at the end of an experiment ionomycin was added to the Fura-2 AM loaded cells to equilibrate Ca<sup>2+</sup> between the extracellular (1mM) and intracellular environments. To calculate R<sub>min</sub>, 1mM EGTA was then added to the bathing solution. Different dissociation constants were used at the different temperatures: 224 nM at 34-37°C and 135 nM at 24-27°C.

#### Determination of inositol phosphate

The level of inositol phosphate metabolism was determined in COS cells transfected with PTH/PTHrP

- 22 -

23  
cont. receptors using previously published methods (Bonventre, et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990).

## RESULTS

### Molecular characterization

5 Two independent clones (OK-H and OK-O), both of which were isolated from the OK cell cDNA library, had lengths of approximately 2 kilobases. The determined  
18 nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of these clones are shown in Figs. 1 (SEQ ID NO.:1) and 2  
10 (SEQ ID NO.:2) respectively. The R15B clone isolated from the ROS cell cDNA library had a length of approximately 4 kilobases. The determined nucleotide  
sequence and predicted amino acid sequence of the rat bone PTH/PTHrP receptor is depicted in Fig. 3 (SEQ ID  
15 NO.:3).

28 The three cDNA clones appear to be full-length by the criteria of having codons encoding methionine residues that are predicted to be the likely candidates as initiator methionines. These methionine codons are  
20 followed by amino acid sequences (deduced from the DNA) with properties suggesting that they are "signal-peptide" sequences. All three receptor cDNAs have stop codons at locations that permit these receptors to "fit" a putative seven-membrane spanning model, a model typical for G-  
25 protein-linked receptors. Most importantly, all three cloned receptors bind ligands and, when activated, are capable of activating intracellular effectors. These properties suggest that all three of the isolated clones encode full-length cDNAs.

30 Fig. 4 demonstrates the high degree of homology between the amino acid sequences encoded by the cDNAs from OK-O and ROS 15B. There is an overall 87% homology and a 77.8% amino acid identity between these two  
33 receptors. This high level of identity over long

- 23 -

30 stretches of amino acids demonstrates that the amino acid  
sequence of the PTH receptor is evolutionarily conserved  
to a high degree. This allows the data from both OK-O  
and R15B to be extrapolated to other species, including  
5 human.

Fig. 5 shows the deduced amino acid sequences of  
all three cloned cDNAs lined up according to sequence  
homology. The OK-H sequence is identical to OK-O except  
in the C-terminus tail, where the OK-O sequence totals  
10 585 amino acids whereas the OK-H sequence stops at 515  
amino acids. This difference is attributable to a single  
nucleotide (G) deleted in the OK-H sequence compared to  
the OK-O sequence, causing a frame shift and early stop  
codon in the former. It is not known whether OK-O and  
15 OK-H represent the products of two separate genes or of a  
laboratory artifact.

Some G-protein-coupled receptors are encoded by  
intronless genes (Kobilka et al., Nature 329:75, 1987);  
Kobilka et al., J. Biol. Chem. 262:7321, 1987; Heckert et  
20 al., Mol. Endocrinol. 6:70, 1992; Kobilka et al., Science  
238:650, 1987; Bonner et al., Science 237:527, 1987;  
Sunahara et al., Nature 347:80, 1990). To isolate a  
human PTH/PTHrP receptor cDNA, both a human cDNA library  
and a human genomic library were screened with a probe  
32 (BamHI/NotI) representing most of the coding region of  
the rat bone PTH/PTHrP receptor (Fig. 3). Screening the  
human kidney cDNA library led to the isolation of the  
clone HK-1 (Fig. 6) [SEQ ID NO.: 6]. Since one of the  
two EcoRI cloning sites of lambda GT10 proved to be  
30 eliminated as a result of the library construction, the  
HindIII/EcoRI phage fragment containing the cDNA insert  
and ~250 bp of the 37 kb (left) lambda arm was subcloned  
into the corresponding restriction sites in pCDNAI. DNA  
sequencing revealed that the cloned cDNA contained ~1000  
35 bp of the 3' coding region and ~200 bp of the 3' non-

- 24 -

32  
5 coding region including an A-rich 3' end. The coding region 5' to the XhoI site was subsequently used to re-screen the library and led to the isolation of the clone HK-2 which, after subcloning into pcDNAI, proved to contain ~1400 bp of the coding region. For the third screening of the library, the PvuII/PstI fragment of HK-2 was used; the isolated clone HK-3 proved to be identical to HK-2.

33  
10 The genomic library screening (~10<sup>6</sup> pfu) resulted in the isolation of four independent clones. Comparison of Southern blot analyses of restriction enzyme digests of these clones with that of normal genomic DNA, revealed that one 15 kb genomic clone, HPG1 (also referred to as HG4A), contained a SstI/SstI fragment that had the same  
15 size as one hybridizing DNA species from normal human genomic DNA digested with SstI (see below). The hybridizing 2.3 kb SstI/SstI DNA fragment and an ~8 kb XhoI fragment which comprised the SstI/SstI fragment were both subcloned into pcDNAI. Further Southern blot  
20 analysis of the SstI/SstI DNA fragment revealed that an ~1000 bp BamHI/SstI fragment encoded a portion of the human PTH/PTHrP receptor which later proved to represent the exon encoding the putative signal peptide and the 5' non-translated region which is interrupted by an ~1000 bp  
25 intron (Fig. 7).

34  
30 To isolate the remaining ~450 nucleotides of the coding region, poly (A)+ RNA from human kidney was reverse transcribed after priming with H12 (Fig. 7). After single strand synthesis, two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) a degenerate primer RK-1 based on the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors, OK-0 and R15B; and ii) primer RK-2 based on the 5' non-coding region of HPG1. H-26 was used as the reverse primer for both  
35 reactions. Southern blot and restriction map analyses



- 25 -

34 confirmed the expected size of the amplified DNA encoding the human PTH/PTHrP receptor. The blunt-ended PCR products encoding the 5' end of the human PTH/PTHrP were cloned into pCDNAI using the dephosphorylated EcoRV sites. Sequence analysis of each PCR clone confirmed their 5' nucleotide difference due to the difference in forward primer sequence, but revealed otherwise identical sequences. Nucleotide sequencing of both strands of the human PTH/PTHrP receptor cDNA revealed an open reading frame encoding a 593-amino acid protein (Fig. 6, SEQ ID NO.:4).

35 The full-length human kidney PTH/PTHrP receptor cDNA, HKrk, was constructed using the BamHI/PvuII fragment of PCR clone #2 and HK-2. Using the full-length cDNA encoding the human PTH/PTHrP receptor, Northern blot analysis of total RNA (~10 µg/lane) from human kidney and SaOS-2 cells revealed one major hybridizing DNA species of ~2.5 kb (Fig. 19). The XhoI digest of normal human genomic DNA, when probed with the same full-length cDNA (Fig. 20), revealed one major hybridizing species of about 5.5 kb, and two DNA species of 4 and 8 kb which weakly hybridized. These data suggest that the human PTH/PTHrP receptor is the product of a single gene. This full-length clone was then transiently expressed in COS-7 cells for functional and biological characterization by the methods cited above.

30 Comparison of the human receptor with the opossum kidney PTH/PTHrP receptor and the rat bone PTH/PTHrP receptor, revealed 81% and 91% amino acid sequence identity, respectively, and consequently a very similar hydrophobicity plot (Fig. 8). All extracellular cysteines including the two cysteine residues in the presumed signal peptide are conserved, as are all potential, extracellular

- 26 -

26 N-glycosylation sites. A number of the amino acids which were not identical between the human kidney and rat bone PTH/PTHr receptors were found to be conserved between the human and the opossum receptors. These conserved amino acids include an Arg to Leu at 51, an Arg to Trp at 58, an Arg to His at 262, an Asp to His at 358, an Ile to Thr at 422, and a Thr to Leu at 427.

#### Biological Characterization

37 Functional characterization of the biological properties of the opossum and rat PTH/PTHrP receptors was performed in transiently transfected COS cells by a radioreceptor assay technique using both  $^{125}\text{I}$ -PTHrP and  $^{125}\text{I}$ -NlePTH as radioligands, and by bioassays that measure ligand-stimulated cAMP accumulation, increase in intracellular free calcium, and stimulation of inositol phosphate metabolism, by the methods cited above.

38 Fig. 9 demonstrates that COS cells expressing OK-H bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by OK-H.

39 Fig. 10 demonstrates that COS cells expressing OK-H increase their concentration of intracellular free calcium when exposed to NlePTH, but to a smaller extent (mean = 39 nm), or not at all, when compared to COS cells expressing OK-O or R15B receptors (Fig. 12 and Fig. 14) and stimulated with NlePTH. Unlike COS cells expressing

- 27 -

OK-O or R15B, COS cells expressing OK-H do not show a detectable increase in metabolism of inositol phosphate when stimulated with NlePTH (Fig. 15).

Fig. 11 demonstrates that COS cells expressing OK-O bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by OK-O.

Fig. 12 demonstrates that COS cells expressing OK-O increase their concentration of intracellular free calcium and their rate of inositol phosphate metabolism after stimulation with NlePTH and PTHrP (Fig. 15).

Fig. 13 demonstrates that COS cells expressing R15B bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by R15B.

Fig. 14 demonstrates that COS cells expressing R15B increase their concentration of intracellular calcium to an extent similar to stimulated COS cells expressing OK-O.

- 28 -

Fig. 15 demonstrates that COS cells expressing R15B or OK-O increase their rate of phosphatidyl inositol hydrolysis, as evidenced by the rapid increase in inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) and inositol bisphosphate ( $IP_2$ ) accumulation after stimulation of the cells with NlePTH or PTHrP. Conversely, COS cells expressing OK-H did not show any detectable increase in inositol trisphosphate and inositol bisphosphate accumulation after stimulation with NlePTH or PTHrP. These data suggest that the PTH receptor encoded by R15B and OK-O is coupled to phospholipase C, presumably through  $G_p$ . Since the only difference between OK-O and OK-H is in the cytoplasmic C-terminal tail, these data strongly suggest that the C-terminus of the PTH receptor encoded by OK-O and R15B is involved in the activation of phospholipase C.

Fig. 16 demonstrates that COS cells expressing R15B and OK-H increase cAMP accumulation after stimulation with NlePTH. Similar results were obtained in COS cells expressing OK-O. No cAMP stimulation was detected in COS cells transfected with the cDM8 vector alone. These data suggest that PTH receptor coupling to adenylate cyclase does not require the full length C-terminal cytoplasmic tail of the receptor.

These data demonstrate that all three PTH/PTHrP receptors cloned from both OK and ROS cell cDNA libraries bind the amino-terminal ligands of both peptides equivalently. Activation of all these receptors by ligand stimulates adenylate cyclase (as measured by increased intracellular cAMP), presumably through activation of one class of guanine nucleotide binding proteins (G-proteins). G-proteins have a trimeric peptide structure in which one of the subunits, alpha, is distinct, and the other two, beta and gamma, are identical or highly homologous. One of these G-proteins

- 29 -

(G<sub>s</sub>) contains G-alpha-"stimulatory" (G-alpha-s) which is involved in the activation of adenylate cyclase.

Binding of ligand to OK-O and R15B, but not to OK-H, also increases intracellular free calcium and stimulates metabolism of inositol phosphate. These properties strongly suggest that activation of both OK-O and R15B receptors by ligand results in stimulation of a second intracellular effector, phospholipase C. The coupling mechanism between these activated receptors and phospholipase C is likely to be a G-protein which is distinct from G<sub>s</sub>. In contrast, the properties of the activated OK-H receptor which is truncated at the carboxy terminus, suggest that it may not activate phospholipase C, or that it activates phospholipase C inefficiently.

The biochemical role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor was further investigated by the construction of a carboxy-terminally-truncated rat receptor, R480, by standard PCR technology using R15B as a template and an upstream primer containing a stop codon inserted at position 481. Briefly, the upstream primer was a synthetic oligonucleotide based on nucleotides 1494-1513 of the rat cDNA sequence (see Fig. 3; SEQ ID NO.: 3) to which a stop codon and an XbaI cloning site were added. Thirty PCR cycles were carried out, each cycle consisting of 1 min at 92°C for denaturation, 1 min at 60°C for annealing, and 1 min at 72°C for extension. The product was cut with NsiI and XbaI and purified by gel electrophoresis. R15B was sequentially digested with XbaI and NsiI, and the purified PCR product was then ligated into the XbaI-NsiI cut R15B vector. The resulting plasmid, R480, was amplified in bacteria and sequenced.

R480 encodes 480 amino acids that are identical to those in the 591 amino acids receptor. This truncated cDNA was expressed in COS-7 cells (transient expression)

- 30 -

and in CHO cells (stable expression). Both COS-7 and CHO cells expressing the truncated receptor, R480, and the wild type receptor, RB, bind PTH(1-34) with equivalent affinities. When activated, R480 stimulates CAMP accumulation in COS7 and CHO cells as efficiently as does the wild type receptor. In contrast to the wild type receptor, R480 did not mediate any increase in  $[Ca^{2+}]_i$  when stimulated by PTH in either the COS-7 cells or the CHO cells. These data indicate that the molecular requirements for activation of phospholipase C and adenylate cyclase by PTH/PTHrP receptor are distinct from each other, and point to a major role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor in coupling to phospholipase C but not to adenylate cyclase. Of course, it is also possible that activated PTH/PTHrP receptors may activate additional G-proteins and/or intracellular effector molecules.

Analysis of COS-7 cells transfected with the cloned human PTH/PTHrP receptor demonstrated that radiolabelled PTH(1-34) and PTHrP(1-36) (~200,000 cpm) bound to the expressed receptors with similar efficiency (specific binding:  $10.1 \pm 3.7\%$  and  $7.6 \pm 6.0\%$ , respectively) to that observed for COS-7 cells expressing R15B (specific binding:  $8.1 \pm 3.5\%$  and  $7.1 \pm 4.1\%$ , respectively). The expressed human PTH/PTHrP receptors bound PTH(1-34) with 2-fold higher apparent  $K_d$  than did the rat bone PTH/PTHrP receptor: ~5 nM versus ~10 nM (Fig. 17). However, despite their high degree of amino acid homology, the two receptors showed significant differences in affinity for PTH(3-34) and PTH(7-34). PTHrP(1-36) displayed a 2- to 4-fold lower affinity for the human PTH/PTHrP receptor than for the rat receptor (~35 nM for HKrk versus ~10 nM for R15B) which appeared more pronounced when PTHrP(1-36) was used as radioligand. The affinities for PTH(3-34) and PTH(7-34) were 7- and

- 31 -

35-fold higher with the expressed HKrK than with R15B (~7 nM versus ~45 nM for PTH(3-34), respectively; ~60 nM versus ~2000 nM for PTH(7-34), respectively). In COS-7 cells expressing either receptor, both PTH(1-34) and PTHrP(1-36) stimulated the increase in intracellular free calcium and cAMP accumulation to the same extent (Fig. 18).

#### Relationship of PTH/PTHrP receptors

The amino acid sequence of the human PTH/PTHrP receptor displays a very high degree of conservation compared to the bone PTH/PTHrP receptor from rat, a eutherian mammal, while its sequence identity with the PTH/PTHrP receptor with the opossum, a marsupial mammal, is less marked. Like the opossum kidney and the rat bone receptor, the human kidney receptor induces an increase in both intra-cellular cAMP and intracellular free calcium when challenged with either PTH or PTHrP. Despite the high degree of homology between the human PTH/PTHrP receptor and the opossum and rat homologs, the transiently expressed human receptor has some functional characteristics that are distinct from those of the rat bone receptor. These include a slightly higher affinity for PTH(1-34) and a significantly decreased affinity for PTHrP(1-36). Higher affinities were observed for PTH(3-34) and in particular for PTH(7-34), the affinity of which for the human receptor was about 35-fold higher in comparison to the rat bone receptor. These findings may have significant implications for the future development of PTH/PTHrP analogues, since they predict that species-specific tissues would be the appropriate tissues for testing the potency of antagonists (and agonists) *in vitro*.

#### Relationship of PTH/PTHrP receptors to other receptors

The biochemical properties of PTH and PTHrP receptors suggest that they are members of the class of

- 32 -

membrane receptor molecules known as G-protein-linked membrane receptors. The structural features of well-characterized G-protein receptors indicate that they all have at least seven regions of several consecutive  
5 hydrophobic amino acids, each of which regions is of sufficient length to span the plasma membrane.

One subfamily of G-protein-linked membrane receptors, termed the glycopeptide receptor subfamily, includes receptors that bind and are activated by  
10 glycopeptide hormones (thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and chorionic gonadotropin). All of these receptors are characterized by (1) extensive putative amino-terminal extracellular domains (greater than 300 amino acids) that  
15 are thought to contain some or all of the ligand-binding domains, and (2) considerable amino-acid homology, particularly in the seven putative transmembrane domains. A second subfamily, termed the adrenergic/muscarinic  
20 subfamily, includes receptors that are activated by small ligands, such as the catecholamines, neuromuscular transmitters, and retinol. These receptors are all characterized by relatively short (25-75 amino acids) putative amino-terminal extracellular domains, as well as considerable amino acid homology, particularly in the  
25 seven putative transmembrane domains. Activation of these receptors by their ligands appears to involve at least several of the multiple transmembrane domains, and does not appear to involve the amino-terminal portion of the receptors.

30 Several structural characteristics which can be deduced from the predicted amino acid sequence of the rat PTH/PTHrP receptor (Fig. 3) indicate that the PTH/PTHrP is a G-protein-linked receptor. The amino terminus shows characteristic features of a signal peptide, including a  
35 hydrophobic domain and the presence of three consecutive



- 33 -

leucine residues. This amino acid stretch of 20-28 amino acids may serve as a leader sequence, similar to the amino terminus preceding the extracellular domains of other glycoprotein receptors. There is also a cluster of 5 seven hydrophobic segments which represent putative membrane-spanning domains (Fig. 19).

The predicted amino acid sequences of the opossum kidney, rat bone and human kidney PTH/PTHrp receptors indicate that they do not fit comfortably into either of these G-protein linked receptor subfamilies. Overall homology of the rat and human PTH/PTHrP receptors with the glycopeptide receptor and adrenergic/muscarinic subfamilies is approximately 10 to 20%, with a somewhat higher degree of homology within the transmembrane domains. The latter is to be expected because of the limited menu of hydrophobic amino acids that could occur in those regions. Twenty percent homology is far less than that found among the receptors generally accepted to be members of each of these subfamilies. Additionally, there are no portions of these sequences that have what could be characterized as intense homology (i.e., exactly matching amino acid sequences), even over limited regions.

Recent comparison with the newly characterized secretin and calcitonin receptors (Ishihara et al., EMBO J 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1991) has revealed between 30 and 40% identity between these receptors and the PTH/PTHrP receptor. Although the PTH/PTHrP receptor is more than 100 amino acids longer than the calcitonin receptor, there is an ~32% identity between the amino acid sequences of the opossum kidney PTH/PTHrP receptor (SEQ ID NO NO.:2) and porcine kidney calcitonin receptor (GenBank accession no. M74420). A stretch of 17 out of 18 amino acids in the putative transmembrane domain VII are identical. Also, two out of

- 34 -

44  
5 four N-linked glycosylation sites and the position of  
seven out of eight potentially extracellular cysteines  
are conserved. Major differences between the two  
receptors appear to lie in their NH<sub>2</sub>-terminal and COOH-  
10 terminal domains. Comparison of amino acid sequences of  
the rat secretin receptor (GenBank accession no. X59132)  
and the human PTH/PTHrP receptor indicates that there is  
a 43% identity between these two receptors, with a  
stretch of 21 out of 25 amino acids of the putative  
15 transmembrane domain VII being identical. The similarity  
between the PTH/PTHrP, calcitonin and secretin receptors  
suggests that they represent a new family of seven  
transmembrane-spanning G protein-coupled receptors that  
activate adenylate cyclase. Given the amino acid  
20 sequences of these receptors, those skilled in the art  
would be able to compare these sequences for regions of  
identity which would be useful in the design of nucleic  
acid probes which could then be used for the  
identification and isolation of other receptors which  
would belong to this family.

#### Deposit of Clones

45  
25 Under the terms of the Budapest Treaty on the  
International Recognition of the Deposit of  
Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure, the  
cDNA expression plasmids R15B, OK-O, and OK-H; the phage  
HPG1; and a plasmid (termed 8A6) containing part of the  
human clone have been deposited with the American Type  
Culture Collection (ATCC), where they bear the respective  
accession numbers ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998 and  
30 68570. Applicants' assignee, The General Hospital  
Corporation, represents that the ATCC is a depository  
affording permanence of the deposits and ready  
accessibility thereto by the public if a patent is  
granted. All restrictions on the availability to the

- 35 -

public of the material so deposited will be irrevocably removed upon the granting of a patent. The material will be available during the pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be  
5 entitled thereto under 37 CFR 1.14 and 35 U.S.C. 122. The deposited material will be maintained with all the care necessary to keep it viable and uncontaminated for a period of at least five years after the most recent  
10 request for the furnishing of a sample of the deposited plasmid, and in any case, for a period of at least thirty (30) years after the date of deposit or for the enforceable life of the patent, whichever period is longer. Applicants' assignee acknowledges its  
15 responsibility to replace the deposits should the depository be unable to furnish a sample when requested due to the condition of the deposit.

#### POLYPEPTIDES

Polypeptides according to the invention include the opossum and rat and human parathyroid hormone  
20 receptors as shown in Figs. 1-3 and 6, respectively, and any other naturally-occurring receptor which can be produced by methods analogous to those used to clone and express these receptors, or by methods utilizing as a  
25 probe all or part of one of the sequences described herein. In addition, any analog or fragment of a PTH receptor capable of binding to a parathyroid hormone or a parathyroid hormone-related protein is within the invention.

Specific receptor analogs of interest include  
30 full-length or partial receptor proteins having an amino acid sequence which differs only by conservative amino acid substitutions: for example, substitution of one  
35 amino acid for another of the same class (e.g., valine for glycine; arginine for lysine, etc.), or by one or more non-conservative amino-acid substitutions,

- 36 -

deletions, or insertions located at positions which do not destroy the receptor's ability to bind to parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein.

Specific receptor fragments of particular interest include, but are not limited to, portions of the receptor deduced to be extracellular from the primary amino acid sequence, using a hydrophobicity/hydrophilicity calculation such as the Chou-Fasman method (see, e.g., Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47:251, 1978). Hydrophilic domains, particularly ones surrounded by hydrophobic stretches (e.g., transmembrane domains) of at least 10 amino acids, present themselves as strong candidates for extracellular domains. Fig. 21 illustrates a predicted arrangement of extracellular, intracellular, and transmembrane domains of one PTH receptor.

Examples of specific PTH receptor fragments include those with the following amino acid sequences (shown as standard single-letter symbols), derived from the deduced amino acid sequence of the R15B clone:

Extracellular domains:

RP-1: TNETREREVFDRLGMIYTVG (SEQ ID NO.: 5)

RP-2: VLYSGFTLDEAERLTEEEL (SEQ ID NO.: 6)

RP-3: VTFFLYFLATNYYWILVEG (SEQ ID NO.: 7)

RP-4: Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP (SEQ ID NO.: 8)

RP-5: PYTEVSGTLWQIQMHYEM (SEQ ID NO.: 9)

RP-6: DDVFTKEEQIFLLHRAQA (SEQ ID NO.: 10)

Intracellular domains:

RPI-7: FRRLHCTRNY (SEQ ID NO.: 11)

RPI-8: EKKYLWGFTL (SEQ ID NO.: 12)

RPI-9: VLATKLRETNAGRCDTQQYRKLLK (SEQ ID NO.: 13)

These fragments were synthesized and purified by HPLC according to the method of Keutmann et al.,

(Endocrinology 117: 1230, 1984).

- 37 -

EXPRESSION OF POLYPEPTIDES

5 Polypeptides according to the invention may be produced by expression from a recombinant nucleic acid having a sequence encoding part or all of a cell receptor of the invention, using any appropriate expression system: e.g., transformation of a suitable host cell (either prokaryotic or eukaryotic) with the recombinant nucleic acid in a suitable expression vehicle (e.g., pCDNAI). The precise host cell used is not critical to 10 the invention; however, in the case wherein the polypeptides of the invention include all or part of the PTH/PTHrP receptor, the following host cells are preferred: COS cells, LLC-PK1 cells, OK cells, AtT20 cells, and CHO cells. The method of transfection and the 15 choice of expression vehicle will depend on the host system selected. Mammalian cell transfection methods are described, e.g., in Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989); expression vehicles may be chosen from those discussed, 20 e.g., in Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987). Stably transfected cells are produced via integration of receptor DNA into the host cell chromosomes. Suitable DNAs are inserted into pCDNA, pCDNAI-Neo, or another suitable plasmid, and 25 then cells are transfected with this plasmid with or without cotransfection with psV-2-Neo, or psV-2-DHFR by standard electroporation, calcium phosphate, and/or DEAE/Dextran techniques. Selection of transfected cells is performed using progressively increasing levels of 30 G418 (Geneticin, GIBCO), and if necessary, methotrexate.

52 DNA sequences encoding the polypeptides of the invention can also be expressed in a prokaryotic host cell. DNA encoding a cell receptor or receptor fragment is carried on a vector operably linked to control signals 35 capable of effecting expression in the prokaryotic host.

- 38 -

If desired, the coding sequence may contain, at its 5' end, a sequence encoding any of the known signal sequences capable of effecting secretion of the expressed protein into the periplasmic space of the host cell, thereby facilitating recovery of the protein and subsequent purification. Prokaryotes most frequently used are various strains of E. coli; however, other microbial strains may also be used. Plasmid vectors are used which contain replication origins, selectable markers, and control sequences derived from a species compatible with the microbial host. For example, E. coli may be transformed using derivatives of pBR322, a plasmid constructed by Bolivar et al. (Gene 2: 95, 1977) using fragments derived from three naturally-occurring plasmids, two isolated from species of Salmonella, and one isolated from E. coli. pBR322 contains genes from ampicillin and tetracycline resistance, and thus provides multiple selectable markers which can be either retained or destroyed in constructing the desired expression vector. Commonly used prokaryotic control sequences (also referred to as "regulatory elements") are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences. Promoters commonly used to direct protein expression include the beta-lactamase (penicillinase), the lactose (lac) (Chang et al., Nature 198: 1056, 1977) and the tryptophan (Trp) promoter systems (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980) as well as the lambda-derived P<sub>L</sub> promoter and N-gene ribosome binding site (Simatake et al., Nature 292:128, 1981).

The nature of the cell receptor proteins of the invention is such that, upon expression within a cell, it is moved to the cellular membrane and partially through the membrane, so that part of it remains embedded in the

- 39 -

membrane, part extends outside the cell, and part remains within the cell. Transformed cells bearing such embedded cell receptors may themselves be employed in the methods of the invention, or the receptor protein may be  
5 extracted from the membranes and purified.

Expression of peptide fragments lacking the hydrophobic portions of the protein responsible for anchoring the intact protein in the cellular membrane would not be expected to become embedded in the membrane;  
10 whether they remain within the cell or are secreted into the extracellular medium depends upon whether or not a mechanism promoting secretion (e.g., a signal peptide) is included. If secreted, the polypeptide of the invention can be harvested from the medium; if not, the cells must  
15 be broken open and the desired polypeptide isolated from the entire contents of the cells. Specific examples of polypeptides which might be expressed include, without limitation:

1) Amino-terminal portion comprising amino acids  
20 1-192, including the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.

2) Amino-terminal portion comprising amino acids 27-192, excluding the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.

25 3) The full-length PTH/PTHrP receptor from rat bone, as shown in Fig 3.

4) RP-1 (as described above).

5) RP-2 (as described above).

The polypeptide of the invention can be readily  
30 purified using affinity chromatography. Antibodies to these polypeptides, or the receptor specific ligands, (e.g., the hormones PTH and PTHrP for the PTH/PTHrP receptor) may be covalently coupled to a solid phase support such as Sepharose 4 CNBr-activated sepharose  
35 (Pharmacia), and used to separate the polypeptide of the

- 40 -

invention from any contaminating substances. Typically 1 mg of ligand or antibody will be incubated with CNBr-activated sepharose at 4°C for 17-20 h (with shaking). The sepharose is rinsed with 1 M Tris HCL (pH8) to block excess active sites. The sepharose-PTH, sepharose-PTHrP, or sepharose-antibody is then incubated with the crude polypeptide in phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4°C for 2 h (with shaking). The sepharose is then typically packed in a column, thoroughly washed with PBS (typically 10 times the column volume), and eluted with dilute HCL in H<sub>2</sub>O (pH 1.85). The eluate may then be concentrated by lyophylization and its purity checked, for example, by reverse phase HPLC.

#### ANTI-CELL RECEPTOR ANTIBODIES

Cell receptor or receptor fragments of the invention may be used to generate antibodies by any conventional method well known to those skilled in the art, including those which generate polyclonal antibodies and those which generate monoclonal antibodies. For example, the deduced amino acid sequence of the PTH receptor reveals a protein structure that appears to have several transmembrane (i.e., hydrophobic) domains interspersed with presumably extracellular and intracellular regions (see Fig. 21) analogous to those found in other G protein-linked receptors. This information can be used to guide the selection of regions of the receptor protein which would be likely to be exposed on the cell surface, and thus would be presented to antibodies in vivo. A short peptide representing one or more of such regions may be synthesized (e.g., chemically or by recombinant DNA techniques) and used to immunize an animal (e.g., a rabbit or a mouse) to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, certain of the peptides of the PTH/PTHrP receptor listed above (RP-1, RP-5 and RP-6) have been



- 41 -

chemically synthesized using standard techniques and used to generate polyclonal antibodies in rabbits by the following procedure:

A preparation of a given peptide emulsified with  
5 complete Freund's Adjuvant is injected intradermally into rabbits. Booster injections are emulsified in or complete adjuvant and injected at monthly intervals.

Antibody titer is assessed using either of two methods. First, serial dilutions of the antiserum in 1%  
10 normal rabbit serum are incubated with  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH/PTHrP receptor fragment by standard methods (e.g., see Segre et al., supra) for 24 h at 4° C. The bound  $^{125}\text{I}$ -PTH/PTHrP receptor fragments are separated from unbound by addition of 100  $\mu\text{l}$  of second antibody (anti-  
15 rabbit IgG, Sigma) diluted 1:20 and 1 ml of 5% polyethylene glycol, followed by centrifugation at 2000 rpm for 30 min. at 4° C. The supernatant is removed and the pellet analyzed for radioactivity in a  $\gamma$ -counter. In the second method, cell lines expressing either native  
20 (e.g., ROS 17/2.8, OK, SaOS-02 cells) or recombinant (COS cells or CHO cells transfected with R15B, OK-O or OK-H) PTH/PTHrP receptors are incubated with serially diluted antibody at 4°C, 20°C or 37°C for  
1- 4 h. The cells are rinsed with PBS (x3) and incubated  
25 for 2 h at 4°C with  $^{125}\text{I}$ -labelled (NEN, Dupont) or FITC-labelled (Sigma) second antibodies. After rinsing (x3 with PBS), the cells were either lysed with 0.1 M NaOH and counted in  $\gamma$ -counter (if  $^{125}\text{I}$ -labelled second antibody was used) or fixed with 1% paraformaldehyde and examined  
30 by fluorescent microscopy (if FITC-labelled second antibody was used).

Another method for producing antibodies utilizes as antigen the intact cell receptor protein of the invention expressed on the surface of cells (e.g.,  
35 mammalian cells, such as COS cells, transfected with DNA

- 42 -

encoding the receptor). Such cells are prepared by standard techniques, e.g., by the DEAE-dextran transfection method, using a vector encoding and capable of directing high-level expression of the cell receptor.

- 5 Such cells may be used to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, monoclonal antibodies specific for the PTH/PTHrP receptor may be produced by the following procedure:

Intact COS cells expressing high levels of rat  
10 recombinant PTH receptors on the cell surface are injected intraperitoneally (IP) into Balb-c mice (Charles River Laboratories, Willmington, MA). The mice are boosted every 4 weeks by IP injection, and are hyperimmunized by an intravenous (IV) booster 3 days  
15 before fusion. Spleen cells from the mice are isolated and are fused by standard methods to myeloma cells. Hybridomas are selected in standard hypoxanthine/aminopterin/thymine (HAT) medium, according to standard methods. Hybridomas secreting antibodies  
20 which recognize the PTH receptor are initially identified by screening with cell lines which naturally express abundant copies of the PTH-receptor per cell (such as ROS17/2.8 or OK cells), using standard immunological techniques. Those hybridomas which produce antibodies  
25 capable of binding to the PTH receptor are cultured and subcloned. Secondary screening with radioreceptor and cAMP stimulation assays can then be performed to further characterize the monoclonal antibodies (see below).

#### SCREENING FOR PTH RECEPTOR ANTAGONISTS AND AGONISTS

- 30 The polypeptides and antibodies of the invention and other compounds may be screened for PTH-competition and for antagonistic or agonistic properties using the assays described herein.

In one example, those antibodies that recognize  
35 the PTH receptor on the intact cells are screened for

- 43 -

their ability to compete with PTH or PTHrP for binding to a PTH/PTHrP receptor. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with the  $^{125}\text{I}$ -PTH analog,  $^{125}\text{I}$ -NlePTH or  $^{125}\text{I}$ -PTHrP in the presence or absence of

5 the polyclonal or monoclonal antibody to be tested, for 4 h at 15°C. The antibody used may be from crude antiserum, cell medium, or ascites, or in purified form. After incubation, the cells are rinsed with binding buffer (e.g., physiological saline), lysed, and

10 quantitatively analyzed for radioactivity using a gamma-counter. Antibodies that reduce binding of the PTH analog to the PTH receptor are classified as competitive; those which do not are noncompetitive.

Compounds, including antibodies and polypeptides,

15 may be screened for their agonistic or antagonistic properties using the cAMP accumulation, intracellular calcium, and/or inositol phosphate assays described above. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with PTH, PTH-receptor antibody, or a

20 combination of both, for 5 - 60 minutes at 37°C, in the presence of 2 mM IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Sigma, St. Louis, MO). Cyclic AMP accumulation is measured by specific radio-immunoassay, as described above. A compound that competes with PTH for binding to

25 the PTH receptor, and that inhibits the effect of PTH on cAMP accumulation, is considered a competitive PTH antagonist. Conversely, a compound that does not compete for PTH binding to the PTH receptor, but which still prevents PTH activation of cAMP accumulation (presumably

30 by blocking the receptor activation site) is considered a non-competitive antagonist. A compound that competes with PTH for binding to the PTH receptor, and which stimulates cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, is a competitive agonist. A compound that does

35 not compete with PTH for binding to the PTH receptor but

- 44 -

which is still capable of stimulating cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, or which stimulates a higher accumulation than that observed by PTH alone, would be considered a non-competitive agonist.

##### 5 USE

The polypeptides, antibodies, and other compounds of the invention are useful for the diagnosis, classification, prognosis, and/or treatment of disorders which may be characterized as related to the interaction  
10 between a cell receptor of the invention and its specific ligand. For example, some forms of hypercalcemia and hypocalcemia are related to the interaction between PTH and PTHrP and the PTH/PTHrP receptor(s). Hypercalcemia is an condition in which there is an abnormal elevation  
15 in serum calcium level; it is often associated with other diseases, including hyperparathyroidism, osteoporosis, carcinomas of the breast, lung and prostate, epidermoid cancers of the head and neck of the esophagus, multiple myeloma, and hypernephroma. Hypocalcemia, a condition in  
20 which the serum calcium level is abnormally low, may result from a deficiency of effective PTH, e.g., following thyroid surgery.

In a first example, the compounds of the invention are used to manufacture diagnostic agents which are used  
25 as diagnostic tools to diagnose hypercalcemia and to distinguish between hypercalcemic conditions, i.e., to differentiate hypercalcemia mediated by PTH or PTHrP (e.g., hyperparathyroidism and humoral hypercalcemia of malignancy), from hypercalcemia associated with diseases  
30 which do not involve these factors (e.g., local osteolytic hypercalcemia mediated by the presence of metastatic tumor cells in direct contact with bone, and certain rare types of malignancy-related hypercalcemias mediated by an increase of humoral factors, such as  
35 osteoclast activating factor (interleukin), lymphotoxin,

- 45 -

calcitriol, type E prostaglandins, and vitamin D-like sterols).

In one method of diagnosis, serum total and/or ionized calcium levels are measured by standard techniques before and after the administration of the PTH or PTHrP antagonists of the invention. PTH or PTHrP related hypercalcemias would be detectable as a decrease in serum calcium levels following administration of the antagonist of the invention. In contrast, for hypercalcemic conditions mediated by factors other than PTH or PTHrP, the serum calcium levels would remain unchanged even after administration of the antagonist.

Another diagnostic application of the invention permits measurement of the level of PTH or PTHrP in a biological sample in order to diagnose PTH or PTHrP related tumors, e.g., tumors which are associated with humoral hypercalcemia of malignancy, and for monitoring the levels of PTH or PTHrP during cancer therapy. This method involves assaying binding of the recombinant parathyroid hormone receptor of the invention to PTH or PTHrP present in a tissue sample, using the binding assay described herein. The level of binding may be determined directly (e.g., by using radioactively labelled PTH receptor, and assaying the radioactivity bound to endogenous PTH). Alternatively, binding of PTH receptor to the sample (e.g., a tissue section) may be followed by staining of the tissue sections with an antibody specific for the PTH receptor, using standard immunological techniques (Chin et al., Hybridoma 5:339, 1986).

In a third diagnostic approach, one could stably transfect cell lines (by the methods described in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987) with a PTH receptor gene linked to an appropriate promoter (e.g., the metallothionine promoter). Alternatively, the PTH/PTHrP

- 46 -

receptor could be expressed from a eukaryotic vector, i.e., pcDNAI, and cotransfected with a mutant DHFR gene that will allow further gene amplification via methotrexate selection (Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80:2495-2499, 1983). Such high-level expression of the gene produces an immortal cell line which is oversensitive to PTH or PTHrP. Such cells provide a particularly useful tool for detecting serum blood levels of PTH or PTHrP. Such a cell line may be used for diagnosis of conditions involving elevated PTH or PTHrP levels (e.g., those described above) or for conditions involving unusually low levels of PTH or PTHrP (e.g., those described above). Such a cell line is also useful for monitoring the regression or increase of PTH or PTHrP levels during therapy for hypercalcemia or hypocalcemia, respectively.

A patient who is suspected of being hypercalcemic may be treated using the compounds of the invention. Rapid intervention is important because symptoms may appear abruptly and, unless reversed, can be fatal. In one application, serum calcium levels are stabilized by an immediate course of treatment which includes antagonists of PTH or PTHrP. Such antagonists include the compounds of the invention which have been determined (by the assays described herein) to interfere with PTH receptor-mediated cell activation. To administer the antagonist, the appropriate antibody or peptide (is used in the manufacture of a medicament, generally by being formulated in an appropriate carrier such as physiological saline, and administered intravenously, at a dosage that provides adequate competition for PTH or PTHrP binding to the PTH receptor (e.g., a dosage sufficient to lower the serum calcium level to below 10 mg/dl). Typical dosage would be 1 ng to 10 mg of the antibody or peptide per kg body weight per day.

- 47 -

Treatment may be repeated as necessary for long term maintenance of acceptable calcium levels (i.e., levels < 10.1 mg/dl). This may be necessary for acute treatment of an underlying disease condition triggering

5 hypercalcemia; or it may be used, e.g., for chronic treatment of conditions such as osteoporosis.

In another application, the compounds of the invention which have been characterized, according to the methods of the invention, to be agonists are used  
10 therapeutically to treat hypocalcemia: e.g., that resulting from the partial or complete surgical removal of the parathyroid glands. Agonists may be formulated in a suitable carrier (e.g., physiological saline) and are preferably administered intravenously in a dosage that  
15 causes a rise in serum calcium to an acceptable level (i.e., approximately 8 mg/dl). A useful dosage range would be 1 ng to 10 mg of the agonist per kg body weight per day. Treatment may be repeated as necessary to maintain suitable serum calcium levels; long term  
20 treatment may be necessary for patients who have undergone parathyroid gland removal.

The nucleic acids of the invention may also be used therapeutically. Oligonucleotides which are antisense to PTH receptor mRNA (or nucleic acid  
25 constructs which express RNA that is antisense to PTH receptor mRNA) may be utilized as an anticancer therapy. This approach is useful, e.g., for hypercalcemias resulting from a genomic rearrangement or amplification which increases the amount or activity of PTH receptor,  
30 PTH or PTHrP. The method would involve introduction of the antisense oligonucleotide into the tumor cells in vivo. The antisense strand hybridizes with endogenous PTH receptor mRNA, interfering with translation of the protein, thereby reducing production of PTH receptor in  
35 such cells, and reducing PTH/PTHrP-associated neoplastic

- 48 -

growth. Methods for antisense design and introduction into host cells are described, for example, in Weinberg et al., U.S. Patent No. 4,740,463, herein incorporated by reference. The biochemical characterization of the OK-H, OK-O and R15B PTH/PTHrP receptors of the invention demonstrate that the two transduction pathways now known to be triggered by the interaction of PTH with its receptor are distinct and may be separated. The predicted amino acid sequences of these receptors indicate that OK-H, which does not appear to activate inositol phosphate metabolism to any detectable degree, is 70 amino acids shorter at the carboxy-terminus than OK-O or R15B. By using the sequences of the invention and the information disclosed herein, one could clone and then alter (e.g. by site-directed mutagenesis) PTH/PTHrP receptor genes from any species to generate PTH/PTHrP receptors which do not activate phospholipase C. This could potentially allow the separation of different PTH-mediated actions, including bone resorption and bone formation, and could of great importance for the treatment of various bone disorders such as osteoporosis.

Nucleic acids of the invention which encode a PTH receptor may also be linked to a selected tissue-specific promoter and/or enhancer and the resultant hybrid gene introduced, by standard methods (e.g., as described by Leder et al., U.S. Patent No. 4,736,866, herein incorporated by reference), into an animal embryo at an early developmental stage (e.g., the fertilized oocyte stage), to produce a transgenic animal which expresses elevated levels of PTH receptor in selected tissues (e.g., the osteocalcin promoter for bone). Such promoters are used to direct tissue-specific expression of the PTH receptor in the transgenic animal. The form of PTH receptor utilized can be one which encodes a PTH receptor similar to that of the animal species used, or



- 49 -

it can encode the PTH receptor homolog of a different species. In one particular example, transgenic chickens are engineered to express the PTH receptor from a promoter which directs high-level expression in chicken oviducts. Such an animal is expected to produce eggs with higher calcium content, and thus harder shells.

#### Other Embodiments

Other embodiments are within the following claims. For example, the nucleic acid of the invention includes genes or cDNAs or RNAs originally isolated from any vertebrate species, including birds or mammals such as marsupials, rodents, or humans. The high degree of homology demonstrated for the PTH receptors from such diverse species as opossum, rat, and human indicates that the methods of isolating PTH receptors disclosed herein will be broadly applicable to the isolation of related cell receptors from a wide variety of species.

- 50 -

COMPUTER SUBMISSION OF DNA AND AMINO ACID SEQUENCES

## (1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Segre, Gino V.  
Kronenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abdul-Badi  
Juppner, Harald  
Potts, John T., Jr.  
Schipani, Ernestina
- (ii) TITLE OF INVENTION: PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA  
ENCODING SAME
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- (A) ADDRESSEE: Fish & Richardson  
(B) STREET: 225 Franklin Street  
(C) CITY: Boston  
(D) STATE: Massachusetts  
(E) COUNTRY: U.S.A.  
(F) ZIP: 02110-2804
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: 3.5" Diskette, 1.44 Mb storage  
(B) COMPUTER: IBM PS/2 Model 50Z or 55SX  
(C) OPERATING SYSTEM: IBM P.C. DOS (Version 3.30)  
(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.0)
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:  
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER: 07/681,702  
(B) FILING DATE: April 5, 1991
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
- (A) NAME: Paul T. Clark  
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,162  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 00786/071001
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
- (A) TELEPHONE: (617) 542-5070  
(B) TELEFAX: (617) 542-8906

- 51 -

(C) TELEX: 200154

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH:1862
- (B) TYPE:nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS:double
- (D) TOPOLOGY:linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 1:

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC	115
Met Gly Ala Pro Arg Ile	
1 5	
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC	163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	
10 15 20	
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC	211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	
25 30 35	
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG	259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	
40 45 50	
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA	307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	
55 60 65 70	
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC	355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	
75 80 85	
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT	403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	
90 95 100	
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA	451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	
105 110 115	
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC	499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	
120 125 130	
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	
135 140 145 150	

- 52 -

TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	
170 175 180	
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC	691
Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser	
185 190 195	
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC	739
Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys	
200 205 210	
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG	787
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg	
215 220 225 230	
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC	835
Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser	
235 240 245	
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA	883
Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr	
250 255 260	
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG	931
Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala	
265 270 275	
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG	979
Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
280 285 290	
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT	1027
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
295 300 305 310	
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT	1075
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
315 320 325	
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC	1123
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
330 335 340	
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG	1171
Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln	
345 350 355	

- 53 -

GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT	1219
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn	
360 365 370	
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA	1267
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg	
375 380 385 390	
TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC	1315
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val	
395 400 405	
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG	1363
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro	
410 415 420	
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA	1411
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu	
425 430 435	
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT	1459
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys	
440 445 450	
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA	1507
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg	
455 460 465 470	
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT	1555
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser	
475 480 485	
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG	1603
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val	
490 495 500	
GGA CCT CGA GGG GGC TGG CCT TGT CCC TCA GCC CTC GAC TAGCTCCTGG	1652
Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp	
505 510 515	
GGCTGGAGCC AGTGCCAATG GCCATCACCA GTTGCCTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT	1712
TTCTGAGAAC TCATTGCCTT CATCTGGCCC AGAGCCTGGC ACCAAAGATG ACGGGTATCT	1772
CAATGGCTCT GGACTTTATG AGCCAATGGT TGGGGAACAG CCCCCTCCAC TCCTGGAGGA	1832
GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC	1862

- 54 -

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1863  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 2:

```

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG   60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC   115
                               Met Gly Ala Pro Arg Ile
                               1           5

TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC   163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
          10              15              20

TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC   211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile
          25              30              35

ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG   259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu
          40              45              50

GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA   307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser
          55              60              65              70

AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC   355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro
          75              80              85

CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT   403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp
          90              95              100

GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA   451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly
          105              110              115

GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC   499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp
          120              125              130

```

- 55 -

TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	
135 140 145 150	
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	
170 175 180	
CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC	691
Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser	
185 190 195	
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC	739
Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys	
200 205 210	
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG	787
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg	
215 220 225 230	
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC	835
Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser	
235 240 245	
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA	883
Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr	
250 255 260	
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG	931
Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala	
265 270 275	
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG	979
Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
280 285 290	
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT	1027
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
295 300 305 310	
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT	1075
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
315 320 325	
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC	1123
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
330 335 340	

- 56 -

ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG	1171
Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln	
345 350 355	
GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT	1219
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn	
360 365 370	
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA	1267
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg	
375 380 385 390	
TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC	1315
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val	
395 400 405	
CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG	1363
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro	
410 415 420	
TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA	1411
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu	
425 430 435	
ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT	1459
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys	
440 445 450	
TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA	1507
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg	
455 460 465 470	
TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT	1555
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser	
475 480 485	
ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG	1603
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val	
490 495 500	
GGA CCT CGA GGG GGG CTG GCC TTG TCC CTC AGC CCT CGA CTA GCT CCT	1651
Gly Pro Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ser Pro Arg Leu Ala Pro	
505 510 515	
GGG GCT GGA GCC AGT GCC AAT GGC CAT CAC CAG TTG CCT GGC TAT GTG	1699
Gly Ala Gly Ala Ser Ala Asn Gly His His Gln Leu Pro Gly Tyr Val	
520 525 530	
AAG CAT GGT TCC ATT TCT GAG AAC TCA TTG CCT TCA TCT GGC CCA GAG	1747
Lys His Gly Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Pro Ser Ser Gly Pro Glu	
535 540 545 550	



- 57 -

CCT GGC ACC AAA GAT GAC GGG TAT CTC AAT GGC TCT GGA CTT TAT GAG 1795  
 Pro Gly Thr Lys Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Gly Ser Gly Leu Tyr Glu  
                     555                    560                    565

CCA ATG GTT GGG GAA CAG CCC CCT CCA CTC CTG GAG GAG GAG AGA GAG 1843  
 Pro Met Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Glu Glu Glu Arg Glu  
                     570                    575                    580

ACA GTC ATG TGACCCATAT C 1863  
 Thr Val Met  
                     585

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 2051  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: double  
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 3:

GGCGGGGGCC GCGGCGGCGA GCTCGGAGGC CGGCGGCGGC TGCCCCGAGG GACGCGGCCC 60  
 TAGGCGGTGG CG ATG GGG GCC GCC CGG ATC GCA CCC AGC CTG GCG CTC 108  
                     Met Gly Ala Ala Arg Ile Ala Pro Ser Leu Ala Leu  
                     1                    5                    10

CTA CTC TGC TGC CCA GTG CTC AGC TCC GCA TAT GCG CTG GTG GAT GCG 156  
 Leu Leu Cys Cys Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Val Asp Ala  
                     15                    20                    25

GAC GAT GTC TTT ACC AAA GAG GAA CAG ATT TTC CTG CTG CAC CGT GCC 204  
 Asp Asp Val Phe Thr Lys Glu Glu Gln Ile Phe Leu Leu His Arg Ala  
                     30                    35                    40

CAG GCG CAA TGT GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG CAC ACA GCA GCC 252  
 Gln Ala Gln Cys Asp Lys Leu Leu Lys Glu Val Leu His Thr Ala Ala  
                     45                    50                    55                    60

AAC ATA ATG GAG TCA GAC AAG GGC TGG ACA CCA GCA TCT ACG TCA GGG 300  
 Asn Ile Met Glu Ser Asp Lys Gly Trp Thr Pro Ala Ser Thr Ser Gly  
                     65                    70                    75

AAG CCC AGG AAA GAG AAG GCA TCG GGA AAG TTC TAC CCT GAG TCT AAA 348  
 Lys Pro Arg Lys Glu Lys Ala Ser Gly Lys Phe Tyr Pro Glu Ser Lys  
                     80                    85                    90

GAG AAC AAG GAC GTG CCC ACC GGC AGC AGG CGC AGA GGG CGT CCC TGT 396  
 Glu Asn Lys Asp Val Pro Thr Gly Ser Arg Arg Arg Gly Arg Pro Cys  
                     95                    100                    105

- 58 -

CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT	444
Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly	
110 115 120	
GAA GTG GTG GCA GTA CCT TGT CCC GAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC	492
Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His	
125 130 135 140	
AAA GGC CAT GCC TAC AGA CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG	540
Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val	
145 150 155	
GTT CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG	588
Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys	
160 165 170	
TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GGC	636
Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly	
175 180 185	
ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GCC TCC CTC ACG GTG	684
Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val	
190 195 200	
GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC	732
Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn	
205 210 215 220	
TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC	780
Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser	
225 230 235	
ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG	828
Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu	
240 245 250	
GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA	876
Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Gln Val Pro	
255 260 265	
CCT CCG CCG GCC GCT GCC GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG	924
Pro Pro Pro Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala	
270 275 280	
GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG	972
Val Thr Phe Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu	
285 290 295 300	
GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA	1020
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser	
305 310 315	

- 59 -

GAG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG	1068
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro	
320 325 330	
GCT GTC TTC GTG GCT GTG TGG GTC GGT GTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC	1116
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Gly Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn	
335 340 345	
ACT GGG TGC TGG GAT CTG AGC TCC GGG CAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG	1164
Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly His Lys Lys Trp Ile Ile Gln	
350 355 360	
GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC	1212
Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn	
365 370 375 380	
ATC ATC CGG GTG CTT GCC ACT AAG CTT CGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG	1260
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg	
385 390 395	
TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTG CTC AGG TCC ACG TTG GTG	1308
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val	
400 405 410	
CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCG	1356
Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro	
415 420 425	
TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG	1404
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu	
430 435 440 445	
ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT	1452
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys	
450 455 460	
TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC	1500
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg	
465 470 475	
TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC	1548
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser	
480 485 490	
AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG	1596
Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val	
495 500 505	
GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT	1644
Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro	
510 515 520 525	

- 60 -

GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG	1692
Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly	
530 535 540	
GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC CTA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC	1740
Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro	
545 550 555	
AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC GGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG	1788
Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu	
560 565 570	
GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA	1836
Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu	
575 580 585	
ACA GTC ATG TGA CTGGGCA CTAGGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGGCACA	1885
Thr Val Met	
590	
TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTTTG GCTGGTTGTC TATTCGGGAT CTGGACCAGG	1945
AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTTGCAGG	2005
AATTAAATAT GTTTCCTCAG TTGGATGATG AGGACACAAG GAAGGC	2051

What is claimed is:

- 61 -

Claims

- 1           1.     Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2     encoding a cell receptor of a vertebrate animal, said  
3     receptor having an amino acid sequence with at least 30%  
4     identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3.
- 1           2.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3     sequence shown in FIG. 1 (SEQ. ID NO. 1).
- 1           3.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3     sequence shown in FIG. 3 (SEQ. ID NO. 3).
- 1           4.     The isolated DNA of claim 1, said isolated  
2     DNA being (8A6), deposited with the ATCC and designated  
3     ATCC Accession No. 68570.
- 1           5.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3     sequence shown in Fig. 6 (SEQ. ID. NO. 4).
- 1           6.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3     1 (SEQ. ID NO. 1).
- 1           7.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3     3 (SEQ. ID NO. 3).
- 1           8.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2     DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3     6 (SEQ. ID NO. 4).

- 62 -

1           9.    A purified preparation of a vector, said  
2 vector comprising a DNA sequence encoding a parathyroid  
3 hormone receptor.

1           10.   A cell containing the isolated DNA of claim  
2 1.

1           11.   The cell of claim 10, wherein said cell is  
2 capable of expressing said cell receptor from said  
3 isolated DNA.

1           12.   An essentially homogenous population of  
2 cells, each of which comprises the isolated DNA of claim  
3 1.

1           13.   Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2 encoding a polypeptide capable of binding parathyroid  
3 hormone or parathyroid-hormone-related protein.

1           14.   A method for producing a polypeptide, said  
2 method comprising:

3                providing a cell comprising isolated DNA  
4 encoding a parathyroid hormone receptor or a fragment  
5 thereof; and

6                culturing said cell under conditions  
7 permitting expression of a polypeptide from said DNA.

1           15.   A single-stranded DNA comprising a portion  
2 of a parathyroid hormone receptor gene, said portion  
3 being at least 18 nucleotides long.

1           16.   The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2 said portion is less than all of said parathyroid hormone  
3 receptor gene.

- 63 -

1           17. The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2 said DNA is detectably labeled.

1           18. A single-stranded DNA comprising a portion  
2 of a parathyroid hormone receptor cDNA, said portion  
3 being at least 18 nucleotides long.

1           19. The single-stranded DNA of claim 18, wherein  
2 said DNA is antisense.

1           20. Parathyroid hormone receptor produced by  
2 expression of a recombinant DNA molecule encoding a  
3 parathyroid hormone receptor.

1           21. An essentially purified preparation of the  
2 parathyroid hormone receptor of claim 20.

1           22. An essentially purified preparation of the  
2 parathyroid receptor produced by the expression of the  
3 DNA of claim 5.

1           23. A polypeptide comprising at least six amino  
2 acids and less than the complete amino acid sequence of a  
3 parathyroid hormone receptor, said polypeptide capable of  
4 binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
5 related protein.

1           24. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2 parathyroid hormone receptor is a human parathyroid  
3 receptor.

1           25. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2 fragment comprises

3           (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG,

4           (b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL,

- 64 -

- 5 (c) VTFFLYFLATNYYWILVEG,  
6 (d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP,  
7 (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM,  
8 (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA,  
9 (g) FFRLHCTRNY,  
10 (h) EKKYLWGFTL,  
11 (i) VLATKLRETNAGRCDTRQQYRKLLK, or  
12 (j) a fragment of (a) - (i) which is capable of  
13 binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
14 related protein.

1 26. A therapeutic composition comprising, in a  
2 pharmaceutically-acceptable carrier, (a) a parathyroid  
3 hormone receptor or (b) a polypeptide comprising a  
4 fragment of said receptor.

1 27. An antibody capable of forming an immune  
2 complex with a parathyroid hormone receptor.

1 28. A therapeutic composition comprising the  
2 antibody of claim 27 and a pharmaceutically-acceptable  
3 carrier.

1 29. A method of reducing the level of calcium in  
2 the blood of a mammal, which method comprises  
3 administering the therapeutic composition of claim 26 to  
4 said mammal in a dosage effective to inhibit activation  
5 by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6 protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1 30. A method of reducing the level of calcium in  
2 the blood of a mammal, which method comprises  
3 administering the therapeutic composition of claim 28 to  
4 said mammal in a dosage effective to inhibit activation



- 65 -

5 by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6 protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1           31. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:  
4           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
5 a parathyroid hormone, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and  
7           (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 polypeptide to said parathyroid hormone in the presence  
9 of said candidate compound, with (ii) the level of  
10 binding of said polypeptide to said parathyroid hormone  
11 in the absence of said candidate compound; a lower level  
12 of binding in the presence of said candidate compound  
13 than in its absence indicating that said candidate  
14 compound is capable of competing with said parathyroid  
15 hormone for binding to said receptor.

1           32. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone-related protein  
3 for binding to a parathyroid hormone receptor, said  
4 method comprising:  
5           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
6 a parathyroid hormone-related protein, (i) in the  
7 presence or (ii) in the absence of a candidate compound;  
8 and  
9           (b) comparing (i) the level of binding of said  
10 polypeptide to said parathyroid hormone-related protein  
11 in the presence of said candidate compound, with (ii) the  
12 level of binding of said polypeptide to said parathyroid  
13 hormone-related protein in the absence of said candidate  
14 compound; a lower level of binding in the presence of  
15 said candidate compound than in its absence indicating  
16 that said candidate compound is capable of competing with

- 66 -

17 said parathyroid hormone-related protein for binding to  
18 said receptor.

1 33. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:

4 (a) combining a parathyroid hormone with the  
5 cell of claim 11, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and

7 (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 receptor to said parathyroid hormone in the presence of  
9 said candidate compound, with (ii) the level of binding  
10 of said receptor to said parathyroid hormone in the  
11 absence of said candidate compound; a lower level of  
12 binding in the presence of said candidate compound than  
13 in its absence indicating that said candidate compound is  
14 capable of competing with said parathyroid hormone for  
15 binding to said receptor.

1 34. A compound capable of inhibiting the binding  
2 of parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
3 protein to a parathyroid receptor on the surface of a  
4 cell.

1 35. A therapeutic composition comprising the  
2 compound of claim 34 and a pharmaceutically-acceptable  
3 carrier.

1 36. A method for identifying a DNA sequence  
2 homologous to a parathyroid hormone receptor-encoding DNA  
3 sequence, said method comprising:  
4 providing a genomic or cDNA library;  
5 contacting said library with the single-  
6 stranded DNA of claim 18, under conditions permitting

- 67 -

7 hybridization between said single-stranded DNA and a  
8 homologous DNA sequence in said library; and  
9 identifying a clone from said library which  
10 hybridizes to said single-stranded DNA, said  
11 hybridization being indicative of the presence in said  
12 clone of a DNA sequence homologous to a parathyroid  
13 hormone receptor-encoding DNA sequence.

1 37. A transgenic non-human vertebrate animal  
2 bearing a transgene comprising a DNA sequence encoding  
3 parathyroid hormone receptor or a fragment thereof.

1 38. A diagnostic method comprising:

2 (a) obtaining a first blood sample from an  
3 animal; (b) administering the composition of claim  
4 35 to said animal;

5 (c) obtaining a second blood sample from said  
6 animal subsequent to said administration of said  
7 composition; and

8 (d) comparing the calcium level in said first  
9 blood sample with that in said second blood sample, a  
10 lower calcium level in said second blood sample being  
11 diagnostic for a parathyroid hormone-related condition.

12 39. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
13 DNA sequence encodes a parathyroid hormone receptor.

1

2 40. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
3 for use in therapy or diagnosis.

4 41. The polypeptide of claim 23 for use in  
5 therapy or diagnosis.

6 42. The antibody of claim 27 for use in therapy  
7 or diagnosis.

- 68 -

8           43. The therapeutic composition of claim 26 for  
9 use in therapy for the inhibition of activation by  
10 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
11 protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
12 for the reduction of the level of calcium in the blood of  
13 a mammal.

14           44. The therapeutic composition of claim 28 for  
15 use in therapy for the inhibition of activation by  
16 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
17 protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
18 for the reduction of the level of calcium in the blood of  
19 a mammal.

20           45. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
21 for use in the manufacture of a medicament for use in  
22 therapy for the inhibition of activation by parathyroid  
23 hormone or parathyroid hormone-related protein of a  
24 parathyroid hormone receptor of a mammal or for the  
25 reduction of the level of calcium in the blood of a  
26 mammal.

27           46. The polypeptide of claim 23 for use in the  
28 manufacture of a medicament for use in therapy for the  
29 inhibition of activation by parathyroid hormone or  
30 parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
31 hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
32 level of calcium in the blood of a mammal.

33           47. The antibody of claim 27 for use in the  
34 manufacture of a medicament for use in therapy for the  
35 inhibition of activation by parathyroid hormone or  
36 parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
37 hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
38 level of calcium in the blood of a mammal.

- 69 -

39           48. A method for identifying a hypercalcemic  
40 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
41 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
42 method comprising

43           (a) determining the calcium level of a first  
44 blood sample from the patient,

45           (b) determining the calcium level of a second  
46 blood sample from the patient taken at a time subsequent  
47 after administration of the therapeutic composition of  
48 claim 26, and

49           (c) comparing the calcium levels of the two  
50 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
51 sample being indicative of a condition related to  
52 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
53 protein in the patient.

54           49. A method for identifying a hypercalcemic  
55 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
56 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
57 method comprising

58           (a) determining the calcium level of a first  
59 blood sample from the patient,

60           (b) determining the calcium level of a second  
61 blood sample from the patient taken at a subsequent time  
62 after administration of the therapeutic composition of  
63 claim 28, and

64           (c) comparing the calcium levels of the two  
65 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
66 sample being indicative of a condition related to  
67 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
68 protein in the patient.

1/30

1 of 3

FIG. 1

TGGGCACAGC	CACCCTGTTG	GTAGTCCAGG	GGCCAGCCCA	CTGAGCTGGC	ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT	TGGA CTGGC	CCTAGGGAAC	GGCGGCG	ATG GGA GCG CCC CGG ATC	115	
				Met Gly Ala Pro Arg Ile		
				1 5		
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC	150					
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val						
	10 15 20					
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC	215					
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile						
	25 30 35					
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG	259					
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu						
	40 45 50					
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA	307					
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser						
	55 60 65 70					
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC	355					
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro						
	75 80 85					
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT	403					
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp						
	90 95 100					
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA	411					
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly						
	105 110 115					
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC	499					
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp						
	120 125 130					
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547					
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser						
	135 140 145 150					
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595					
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu						
	155 160 165					
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643					
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp						
	170 175 180					

FIG. 1

CGC	CTC	GGA	ATG	ATC	TAC	ACT	GTG	GGC	TAC	TCC	ATC	TCT	CTG	GGC	TCC	691
Arg	Leu	Gly	Met	Ile	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Gly	Ser	
		185						190					195			
CTC	ACT	GTG	GCT	GTG	CTG	ATT	CTG	GGT	TAC	TTT	AGG	AGG	TTA	CAT	TGC	739
Leu	Thr	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gly	Tyr	Phe	Arg	Arg	Leu	His	Cys	
	200					205					210					
ACC	CGA	AAC	TAC	ATT	CAC	ATG	CAT	CTC	TTC	GTG	TCC	TTT	ATG	CTC	CGG	787
Thr	Arg	Asn	Tyr	Ile	His	Met	His	Leu	Phe	Val	Ser	Phe	Met	Leu	Arg	
	215				220					225					230	
GCT	GTA	AGC	ATC	TTC	ATC	AAG	GAT	GCT	GTG	CTC	TAC	TCG	GGG	GTT	TCC	835
Ala	Val	Ser	Ile	Phe	Ile	Lys	Asp	Ala	Val	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Ser	
				235					240					245		
ACA	GAT	GAA	ATC	GAG	CGC	ATC	ACC	GAG	GAG	GAG	CTG	AGG	GCC	TTC	ACA	883
Thr	Asp	Glu	Ile	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Phe	Thr	
			250					255					260			
GAG	CCT	CCC	CCT	GCT	GAC	AAG	GCG	GGT	TTT	GTG	GGC	TGC	AGA	GTG	GCG	931
Glu	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Lys	Ala	Gly	Phe	Val	Gly	Cys	Arg	Val	Ala	
		265					270					275				
GTA	ACC	GTC	TTC	CTT	TAC	TTC	CTG	ACC	ACC	AAC	TAC	TAC	TGG	ATC	CTG	979
Val	Thr	Val	Phe	Leu	Tyr	Phe	Leu	Thr	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Ile	Leu	
	280					285					290					
GTG	GAA	GGC	CTC	TAC	CTT	CAC	AGC	CTC	ATC	TTC	ATG	GCT	TTT	TTC	TCT	1027
Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	His	Ser	Leu	Ile	Phe	Met	Ala	Phe	Phe	Ser	
	295				300					305					310	
GAG	AAA	AAG	TAT	CTC	TGG	GGT	TTC	ACA	TTA	TTT	GGC	TGG	GGC	CTC	CCT	1075
Glu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Trp	Gly	Phe	Thr	Leu	Phe	Gly	Trp	Gly	Leu	Pro	
				315				320						325		
ACC	CTG	TTT	CTC	GCT	GTG	TGG	ATC	ACC	CTG	AGG	GCT	ACA	CTG	GCC	AAC	1123
Ala	Val	Phe	Val	Ala	Val	Trp	Val	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Ala	Asn	
			330				335						340			
ACT	GAG	TGC	TGG	GAC	CTG	AGT	TGG	GGG	AAT	AAG	AAA	TGG	ATC	ATA	CAG	1171
Thr	Glu	Cys	Trp	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Asn	Lys	Lys	Trp	Ile	Ile	Gln	
		345					350					355				
GTG	CCC	ATC	CTG	GCA	GCT	ATT	GTG	CTG	AAC	TTT	ATT	CTT	TTT	ATC	AAT	1219
Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Ala	Ile	Val	Val	Asn	Phe	Ile	Leu	Phe	Ile	Asn	
	360					365					370					
ATA	ATC	AGA	GTC	CTG	GCT	ACT	AAA	CTC	CGG	GAG	ACC	AAT	GCA	GGG	AGA	1267
Ile	Ile	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Thr	Asn	Ala	Gly	Arg	
	375				380					385					390	

775. 1

[illegible]



4/30

FIG. 2

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG	60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC	115
Met Gly Ala Pro Arg Ile	
1 5	
TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC	163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val	
10 15 20	
TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC	211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile	
25 30 35	
ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG	259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu	
40 45 50	
GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA	307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser	
55 60 65 70	
AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC	355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro	
75 80 85	
CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT	403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp	
90 95 100	
GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA	451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Ser Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly	
105 110 115	
GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTC CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC	499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Trp Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	
120 125 130	
TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CCG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC	547
Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser	
135 140 145 150	
TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CCG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA	595
Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu	
155 160 165	
TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT	643
Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp	
170 175 180	

5/30

FIG. 2

2 of 2

CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser 185 190 195	691
CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys 200 205 210	700
ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg 215 220 225 230	787
GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser 235 240 245	805
ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr 250 255 260	883
GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala 265 270 275	931
GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu 280 285 290	979
GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser 295 300 305 310	1027
GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro 315 320 325	1075
GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn 330 335 340	1120
ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln 345 350 355	1171
GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn 360 365 370	1219
ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg 375 380 385 390	1267

3 of 3

FIG. 2

[illegible]

7/30

1 of 3

FIG. 3

GGCGGGGGCC	GCGGCGGCGA	GCTCGGAGGC	CGGCGGCGGC	TGCCCCGAGG	GACGCGGCCC	60										
TAGGCGGTGG	CG	ATG	GGG	GCC	GCC	CGG	ATC	GCA	CCC	AGC	CTG	GCG	CTC	108		
		Met	Gly	Ala	Ala	Arg	Ile	Ala	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu			
		1				5					10					
CTA	CTC	TGC	TGC	CCA	GTG	CTC	AGC	TCC	GCA	TAT	GCG	CTG	GTG	GAT	GCG	156
Leu	Leu	Cys	Cys	Pro	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	Leu	Val	Asp	Ala	
		15				20					25					
GAC	GAT	GTC	TTT	ACC	AAA	GAG	GAA	CAG	ATT	TTC	CTG	CTG	CAC	CGT	GCC	204
Asp	Asp	Val	Phe	Thr	Lys	Glu	Glu	Gln	Ile	Phe	Leu	Leu	His	Arg	Ala	
	30					35					40					
CAG	GCG	CAA	TGT	GAC	AAG	CTG	CTC	AAG	GAA	GTT	CTG	CAC	ACA	GCA	GCC	252
Gln	Ala	Gln	Cys	Asp	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Val	Leu	His	Thr	Ala	Ala	
45					50					55					60	
AAC	ATA	ATG	GAG	TCA	GAC	AAG	GGC	TGG	ACA	CCA	GCA	TCT	ACG	TCA	GGG	300
Asn	Ile	Met	Glu	Ser	Asp	Lys	Gly	Trp	Thr	Pro	Ala	Ser	Thr	Ser	Gly	
				65					70					75		
AAG	CCC	AGG	AAA	GAG	AAG	GCA	TCG	GGA	AAG	TTC	TAC	CCT	GAG	TCT	AAA	348
Lys	Pro	Arg	Lys	Glu	Lys	Ala	Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Pro	Glu	Ser	Lys	
			80					85					90			
GAG	AAC	AAG	GAC	GTG	CCC	ACC	GGC	AGC	AGG	CGC	AGA	GGG	CGT	CCC	TGT	396
Glu	Asn	Lys	Asp	Val	Pro	Thr	Gly	Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Pro	Cys	
		95					100					105				
CTG	CCC	GAG	TGG	GAC	AAC	ATC	GTT	TGC	TGG	CCA	TTA	GGG	GCA	CCA	GGT	444
Leu	Pro	Glu	Trp	Asp	Asn	Ile	Val	Cys	Trp	Pro	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly	
	110					115					120					
GAA	GTG	GTG	GCA	GTA	CCT	TGT	CCC	GAT	TAC	ATT	TAT	GAC	TTC	AAT	CAC	492
Glu	Val	Val	Ala	Val	Pro	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Phe	Asn	His	
125					130				135						140	
AAA	GGC	CAT	GCC	TAC	AGA	CGC	TGT	GAC	CGC	AAT	GGC	AGC	TGG	GAG	GTG	540
Lys	Gly	His	Ala	Tyr	Arg	Arg	Cys	Asp	Arg	Asn	Gly	Ser	Trp	Glu	Val	
				145					150					155		
GTT	CCA	GGG	CAC	AAC	CGG	ACG	TGG	GCC	AAC	TAC	AGC	GAG	TGC	CTC	AAG	588
Val	Pro	Gly	His	Asn	Arg	Thr	Trp	Ala	Asn	Tyr	Ser	Glu	Cys	Leu	Lys	
			160					165					170			
TTC	ATG	ACC	AAT	GAG	ACG	CGG	GAA	CGG	GAG	GTA	TTT	GAC	CGC	CTA	GGC	636
Phe	Met	Thr	Asn	Glu	Thr	Arg	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Asp	Arg	Leu	Gly	
		175					180					185				
ATG	ATC	TAC	ACC	GTG	GGA	TAC	TCC	ATG	TCT	CTC	GCC	TCC	CTC	ACG	GTG	684
Met	Ile	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Met	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	
	190					195					200					

8/30

FIG. 3

2 of 3

GCT	GTG	CTC	ATC	CTG	GCC	TAT	TTT	AGG	CGG	CTG	CAC	TGC	ACG	CGC	AAC	732
Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Tyr	Phe	Arg	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Arg	Asn	
205					210					215					220	
TAC	ATC	CAC	ATG	CAC	ATG	TTC	CTG	TCG	TTT	ATG	CTG	CGC	GCC	GCG	AGC	780
Tyr	Ile	His	Met	His	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Ser	
				225					230					235		
ATC	TTC	GTG	AAG	GAC	GCT	GTG	CTC	TAC	TCT	GGC	TTC	ACG	CTG	GAT	GAG	828
Ile	Phe	Val	Lys	Asp	Ala	Val	Leu	Tyr	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	
			240					245					250			
GCC	GAG	CGC	CTC	ACA	GAG	GAA	GAG	TTG	CAC	ATC	ATC	CCG	CAG	GTG	CCA	876
Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	His	Ile	Ile	Ala	Gln	Val	Pro	
		255					260					265				
CCT	CCG	CCG	GCC	GCT	GCC	GCC	GTA	GGC	TAC	GCT	GGC	TGC	CGC	GTG	GCG	924
Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Tyr	Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Ala	
	270					275					280					
GTG	ACC	TTC	TTC	CTC	TAC	TTC	CTG	GCT	ACC	AAC	TAC	TAC	TGG	ATT	CTG	972
Val	Thr	Phe	Phe	Leu	Tyr	Phe	Leu	Ala	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Ile	Leu	
285				290					295					300		
GTG	GAG	GGG	CTG	TAC	TTG	CAC	AGC	CTC	ATC	TTC	ATG	GCC	TTT	TTC	TCA	1020
Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	His	Ser	Leu	Ile	Phe	Met	Ala	Phe	Phe	Ser	
			305					310					315			
GAG	AAG	AAG	TAC	CTG	TGG	GGC	TTC	ACC	ATC	TTT	GGC	TGG	GGT	CTA	CCG	1068
Glu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Trp	Gly	Phe	Thr	Ile	Phe	Gly	Trp	Gly	Leu	Pro	
		320				325						330				
GCT	GTC	TTC	GTG	GCT	GTG	TGG	GTC	GCT	GTC	AGA	GCA	ACC	TTG	GCC	AAC	1116
Ala	Val	Phe	Val	Ala	Val	Trp	Val	Gly	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Ala	Asn	
	335					340					345					
ACT	GGG	TGC	TGG	GAT	CTG	AGC	TCC	GGG	CAC	AAG	AAG	TGG	ATC	ATC	CAG	1164
Thr	Gly	Cys	Trp	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	His	Lys	Lys	Trp	Ile	Ile	Gln	
350					355					360					365	
GTG	CCC	ATC	CTG	GCA	TCT	GTT	GTG	CTC	AAC	TTC	ATC	CTT	TTT	ATC	AAC	1212
Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Phe	Ile	Leu	Phe	Ile	Asn	
				370					375					380		
ATC	ATC	CGG	GTG	CTT	GCC	ACT	AAG	CTT	CGG	GAG	ACC	AAT	GCG	GGC	CGG	1260
Ile	Ile	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Thr	Asn	Ala	Gly	Arg	
			385					390					395			
TGT	GAC	ACC	AGG	CAG	CAG	TAC	CGG	AAG	CTG	CTC	AGG	TCC	ACG	TTG	GTG	1308
Cys	Asp	Thr	Arg	Gln	Gln	Tyr	Arg	Lys	Leu	Leu	Arg	Ser	Thr	Leu	Val	
		400					405									
												410				

9/30

3 of 3

FIG. 3

CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCG Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro 415 420 425	1356
TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu 430 435 440 445	1404
ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys 450 455 460	1452
TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg 465 470 475	1500
TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser 480 485 490	1548
AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val 495 500 505	1596
GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro 510 515 520 525	1644
GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly 530 535 540	1692
GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC CTA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro 545 550 555	1740
AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC GGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu 560 565 570	1788
GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu 575 580 585	1836
ACA GTC ATG TGA CTGGGCA CTAGGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGGCACA Thr Val Met 590	1885
TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTTTG GCTGGTTGTC TATTCGGGAT CTGGACCAGG	1945
AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTTGCAGG	2005
AATTAAATAT GTTTCCTCAG TTGGATGATG AGGACACAAG GAAGGC	2051

10/30

Fig. 4

```

1 MGAARIAPSLALLCCPVLSSAYALVDADDVPTKEZQIFLLHRAQAQCDX 50
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
1 MGAPRISHSLALLCCSVLSSVYALVDADDVITKEZQIILLRNAQAQCEQ 50
51 LLKEVLHTAANIHESDKGWTTPASTSGKPRKEKASGKFPYPSKENKDVPTG 100
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
51 RLKEVLR.VPELAESAQDW..MSRSATKXKXPAEKLYPQAEESREVS DR 97
101 SRRGRPCLP?EWDNIWCWPLGAPGEVVAVPCPDYIYDFNHRGHAYRRCDR 150
  ||:..:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
98 SRLQDGFCLPEWDNIWCWPAGVPGKVAVPCPDYFYDFNHRGHAYRRCD S 147
151 NGSWEVVPCHNRTWANYSECLAFMTNETREREVFDRLGHIYTVGYSHSLA 200
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
148 NGSWEVVPCHNRTWANYSECVKPLTNETREREVFDRLGHIYTVGYSSISLG 197
201 SLTVAVLILAYFRRLHCTSNYIHMHLFSLRAASIFVKDAVLYSGFTL 250
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
198 SLTVAVLILGYFRRLHCTSNYIHMHLFVSFHLRAVSIFIKDAVLYSGVST 247
251 DEAEERLTEEELHIIAQVPPPPAAAAGVYAGCRVAVTFFLYFLATNYWIL 300
  ||:|||||:..:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
248 DEIERITEEELRAFTE...PPPADKAGFVGCRAVTVFLYFLTNYWIL 294
301 VEGLYLHSLIFMAFFSEKKYLWGFTIFGHWGLFAVFAVWVGV RATLANTG 350
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
295 VEGLYLHSLIFMAFFSEKKYLWGFTLFGHWGLFAVFAVWVTV RATLANT E 344
351 CNDLSSGHRKWIIOVPILASVVLNFIIFINI:RVLATKLRETNAGRC DTR 400
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
345 CNDLSSGNKRWIIOVPILAAIVVNFIIFINI:RVLATKLRETNAGRC DTR 394
401 OQYRKLLASTLVLPFLGVHYTVFMALPYTEVSGTLWQIQMHYENLFNSF 450
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
395 OQYRKLLXSTLVLMPLFGVHYIVFMATPYTEVSGILWQVQMHYENLFNSF 444
451 QGFFVAIIYCFNGEVOAEIKKSWSRWTLALDFKRRKARSGSSSYSGPHV 500
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
445 QGFFVAIIYCFNGEVOAEIKKSWSRWTLALDFKRRKARSGSSTSYSGPHV 494
501 SHTSVTVVGFRAGLSLPLSPRLPP...ATTNGHSQLPCHAKPGAPATETE 547
  |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
495 SHTSVTVVGFRGLALSLSPLAPGAGASANGRHQLPGYVKGHSISENSL 544
548 TL2VTVAVPRDDGFLNGSCSGLDEEASGSAAPPPLLQEGWETVM. 591
  ...:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
545 PSSGFEPGTXDDGYLNG..SGLYEPHVG.ECPPPLLZEERETVM* 586

```

Gap Weight:	3.000	Average Match:	0.540
Length Weight:	0.100	Average Mismatch:	-0.396
Quality:	712.2	Length:	595
Ratio:	1.215	Gaps:	6
Percent Similarity:	87.113	Percent Identity:	77.835

11/30

Fig. 5

```

R15 MGAARIAPSL ALLLCCPVLS SAYALVDADD VFTKEEQIFL LHRAQAQCDK 50
OkO MGAPRISHSL ALLLCCSVLS SVYALVDADD VITKEEQIIL LRNAQAQCEQ 50
Okh MGAPRISHSL ALLLCCSVLS SVYALVDADD VITKEEQIIL LRNAQAQCEQ 50
----- A -----

R15 LLKEVLHTAA NIMESDKGWT PASTSGKPRK EKASGKFYFE SKENKDVPTG 100
OkO RLKEVLR.VP ELAESAKDW. .MSRSAKTRK EKPAEKLYPQ AEESREVSOR 97
Okh RLKEVLR.VP ELAESAKDW. .MSRSAKTRK EKPAEKLYPQ AEESREVSOR 97

R15 SRRRGRPCLP EWDNIVCWPL GAPGEVVAVP CPDYIYDFNH KGHAYRRCDR 150
OkO SRLQDGFCLP EWDNIVCWPA GVPKGVVAVP CPDYFYDFNH KGRAYRRCDR 147
Okh SRLQDGFCLP EWDNIVCWPA GVPKGVVAVP CPDYFYDFNH KGRAYRRCDR 147
----- B -----
      N      N      N      N
R15 NGSWEVVPGR NRTWANYSEC LKFMTNETRE REVFDRLGMI YTVGYSMSLA 200
OkO NGSWELVPGN NRTWANYSEC VKFLTNETRE REVFDRLGMI YTVGYSSISLG 197
Okh NGSWELVPGN NRTWANYSEC VKFLTNETRE REVFDRLGMI YTVGYSSISLG 197
-----

R15 SLTVAVLILA YFRLHCTRN YIHMHMFLSF MLRAASIFVK DAVLYSGFTL 250
OkO SLTVAVLILG YFRLHCTRN YIHMHMFLSF MLRAVSIFIK DAVLYSGVST 247
Okh SLTVAVLILG YFRLHCTRN YIHMHMFLSF MLRAVSIFIK DAVLYSGVST 247
-- C ----- D -----

R15 DEAERLTEEE LHIIAQVPPP PAAAAGVYAG CRVAVTFPLY FLATNYYWIL 300
OkO DEIERITEEE LRAFTE...P PPADKAGFVG CRVAVTVFLY FLTTNYYWIL 294
Okh DEIERITEEE LRAFTE...P PPADKAGFVG CRVAVTVFLY FLTTNYYWIL 294
----- E -----

R15 VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV GVRATLANTG 350
OkO VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV TVRATLANTE 344
Okh VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV TVRATLANTE 344
----- F ----- G -----

R15 CWDLSSGHKK WIIQVPILAS VVLNPFILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 400
OkO CWDLSSGNKK WIIQVPILAA IVVNPILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 394
Okh CWDLSSGNKK WIIQVPILAA IVVNPILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 394
----- H -----

R15 QQYRKLLRST LVLVPLFGVH YTVFMALPYT EVSGTLWQIQ MHEYENLFNSF 450
OkO QQYRKLLKST LVLVPLFGVH YIVFMATPYT EVSGILWQVQ MHEYENLFNSF 444
Okh QQYRKLLKST LVLVPLFGVH YIVFMATPYT EVSGILWQVQ MHEYENLFNSF 444
----- I -----

R15 QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI RKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSSYSYGPHV 500
OkO QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI KKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSTYSYGPHV 494
Okh QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI KKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSTYSYGPHV 494
-- J -----

R15 SHTSVTNVGP RAGLSLPLSP RLPP...ATT NGHSQLPGEA KPGAPATETE 547
OkO SHTSVTNVGP RGGLALSLSL RLAPGAGASA NGHBQLPGYV KHGSISENSL 544
Okh SHTSVTNVGP RGG..... . . . . .XPCPSA LD 515

R15 TLPVTMAVVK DDGFLNGSCS GLDEEASGSA RPPPLLQEGW ETVM 591
OkO PSSGPEPGTK DDGYLNG..S GLYEPHVG.E QPPPLLEEER ETVM 585

```



12/30

FIG. 6

With 1 enzymes: SACT

February 27, 1992 18:30 ..

```

      GGGATCCCGCGGCCCTAGGCGGTGGCGatgggGAccGCcgggatcgcacccggcctggcg
2  -----+----- 61
      CCCTAGGGCGCCGGGATCCGCCACCCStácccCTggCGggcctagcgtgggcccggaccgc

b      M G T A R : A P G L A -

      ctccctgctctgctgccccgtgctcagctccgcgtacgcgctggtggatgcagatgacgtc
62 -----+----- 121
      gaggacgagacgacggggcacgagtcgaggcgtatgcgcgaccacctacgtctactgcag

b      L L L C C P V L S S A Y A L V D A D D V -

      atgactaaagaggaacagatcttccctgctgcacccgtgctcaggcccagtgcgaaaaacgg
122 -----+----- 181
      tactgattttctccctgctctagaaggacgacgtggcagagtcggggtcacgctttttgccc

b      M T K E E Q I F L L H R A Q A Q C E K R -

      ctcaaggaggctccctgcagaggccagccagcctaatggaatcagacaagggatcgacatct
182 -----+----- 241
      gagttccctccaggacgtctccgggtcgggtcgtattaccttagtctgttccctacctgtaga

b      L K E V L Q R P A S I M E S D K G W T S -

      gcgtccacatcaggggaagcccaggaaagataagccatctgggaagctctacccctgagtct
242 -----+----- 301
      cgcagggtgtagtcccttcgggtccctttctattcccttagacccttcgagatgggactcaga

b      A S T S G K P R K D K A S G K L Y P E S -

      gaggaggacaaggaggcaccactggcagcaggtaccgagggcgccctgtctgccggaa
302 -----+----- 361
      ctccctccctgttccctccgtgggtgacccgtcgtccctggctcccgggggacagacggcctt

b      E E D K E A P T G S T R E R P C L P E -

      tgggaccacatccctctgctggccgctgggggcaccacgtcaggtggtggctgtgccctgt
362 -----+----- 421
      accctgggtgtaggacacgacccggcgaccccccgtgggtccactccaccaccgacacgggaca

b      W D H I L C W P L G A P E E V V A V P C -

      ccggactacatttatgacttcaatcaciaaggccatgcctaccgacgctgtgaccgcaat
422 -----+----- 481
      ggccctgatgtaataactgaaagttagtggttccgggtacggatggctgcgacactggcggtta

b      P D Y I Y D F N H K G A A Y R R C D R N -

      ggcagctgggaagctgctgctcgggcacaacaggacctgggccaactacagcgagtgtgtc
482 -----+----- 541
      ccgtccaccctccgaccacggacccctgttctccctgcacccgggttgatgtcgtcacacag

```

13/80

U G S W E L V P G H N R T W A N I G B C V -  
 542 aaattttctctac atgagactcgtglaacgggaggtgtttgaccgcttgggcatgatttac  
 -----  
 ttttaagagtggttactctgagcacttgccttccacaaactggcggaccggtactaaatg 601  
 b K F L T N E T R E R E V F D R L G M I Y -  
 602 accgtgggctactccgtgtccctggcgtccctcaccgtagctgtgctcatcctggcctac  
 -----  
 tggcaccctgatgaggcacagggaaccgcagggagtggcatcgacacgaataggaccggatg 661  
 b T V G Y S V S L A S L T V A V L I L A Y -  
 662 tttaggcggctgcactgcacgcgaactacatccacatgcacctgttctgtccttcctg  
 -----  
 aaatccgcccacgtgacgtgcgcgttgatgtaggtgtacgtggacaaggacaggaagtac 721  
 b F R R L H C T R N Y I H M H L F L S F M -  
 722 ctgcgcgccttgagcatcttcgtcaaggacgctgtgctctactctggcgcacgcttgat  
 -----  
 gacgcgcgcgaactcgtagaagcagttcctggacacgagatgagaccggtgcgaacta 781  
 b L R A V S I F V K D A V L Y S G A T L D -  
 782 gaggtcagcgcctcaccgaggaggagctgcgcgccatcggccaggcgcggcgccgct  
 -----  
 ctccgactcgcggagtggctcctcctcgacgcgcggtagcgggtccgcggggcggcgga 841  
 b E A E R L T E E E L R A I A Q A P P P P -  
 842 gccaccgcccgtgccggtacgcgggtcgagggtggctgtgaccttcttcttacttc  
 -----  
 cggctggcggcgacggccgatgcgcccacgtcccaccgacactggaagaaggaaatgaag 901  
 b A T A A A G Y A G C R V A V T F F L Y F -  
 902 ctggccaccaactactactcgattctcgttgggggtgtacctgcacagcctcatcttc  
 -----  
 gaccggctgggtgatgatgacctaaaccacctcccgacatcgacgtctcggagtgaag 961  
 b L A T N Y Y W I L V E G L Y L H S L I F -  
 962 atggccttcttctcagagaagaagtacctgtggggcttcacagtcttcgggtggggtctg  
 -----  
 taccggaagaagaagtcttcttctcatggacacccgaaagtgcagaagccgaccccgagac 1021  
 b M A F F S E K K Y L N S F T V F G W G L -  
 1022 cccgctgtcttcgtggctgtgtgggtcagtgctcagagctaccttggccaacaccgggtgc  
 -----  
 gggcgacagaagcaccgacacacccagtcacagctctcgatgggaccggttctggcccacg 1081  
 b P A V F V A V W V S V E A T L A N T G C -

S  
 a  
 c  
 -

14/30

1032 tgggacttgagctcggggaacaaaaagtggtatcctccagggtgccccctcctggcctccatt  
----- 1141  
accctgaactcgaggcccttggtttttcacctagtaggtccacgggtaggaccggaggttaa  
b W D L S E G N K K W I I Q V P I L A S I -  
gtgctcaacttcatcctcttcatcaatatcctccgggtgctcgccaccaagcagcgggag  
1142 ----- 1201  
cacgagttgaagttaggagaagttagttatagcaggccacgagcgggtgggttcgtcgccctc  
b V L N F I L F I N I V R V L A T K Q R E -  
accaacgcccggccggtgtgacacacggcagcagcaccggaagctgctcaaaccacgctg  
1202 ----- 1261  
tgggttggggccggccacactgtgtgcccgtcgtcatggcccttcgacgagtttaggtgcgac  
b T N A G R C D T R Q I Y R K L L K S T L -  
gtgctcatgcccctctttggcggtccactacattgtcttcatggccacaccatacacggag  
1262 ----- 1321  
cacgagtacggggagaaaaccgcaggtgatgttaacagaagcaccgggtgtggtatgtggctc  
b V L M P L F G V H Y I V F M A T P Y T E -  
gtctcagggacgctctgggaagtcagatccactatgagatgctcttcaactccttccag  
1322 ----- 1381  
cagagtccttgcgagaccgttcagggtctacgtcctactctacgagaagttgaggaaaggtc  
b V S G T L W Q V Q M H Y E M L F N S F Q -  
ggattttttgtcgcaatcatatactgtttctccatggcgaggtacaagctgagatcaag  
1382 ----- 1441  
cctaaaaaacagcgttagtatatgacaaaagcgttaccgctccatgttcgactctagttc  
b G F F V A I I Y C F C H G E V Q A E I K -  
aaatcttggagccgctggacactggcactggacttccagcgaaggcagcagcgggagc  
1442 ----- 1501  
tttagaacctcggcgacctgtgacctgtaccttccacttcgcttccgtgctcgccctcg  
b K S W S R W T L A L I T H R K A R S G S -  
agcagctatagctacggcccccctcgtgtcccccacaaagtgtgaccaatgtcggcccccg  
1502 ----- 1561  
tcctccatatacatccgggggtaccacaggggtgtgtccactggttacagccgggggca  
b S S Y S Y G P M V S H T S V T N V G P R -  
gtgggactcggcctgccccctcagccccccctcctgcccactgccaccaccaacggccac  
1562 ----- 1621  
caccctgagcccgacggggagtcggggggcggtacacgggtgacgggtgggtgtgcccgtg  
b V G L G L P L S P R L I F T A T T N G H -  
cctcagctgcccggccatgccaaagccagggaacccacccctggagaccctcgagaccaca  
1622 ----- 1681  
ggagtcgacggaccggtacgggtccggtccctcgggtcgggacctctgggagctctggtgt  
b F Q L P G H A K P G T P A L E T L E T T -

15/30

1632 ----- 1741  
 ggcggacgggtaccgacgaggggttcctgctacccaaaggacttgccgagggacgagtccggac

b P P A M A A P K D D G F L N G S C S G L -

1742 ----- 1801  
 ctgctcctccggagacccggactcgccgggtggacgggacgagtgtccttctcacccctctgt

b D E E A S G P E R P P A L L Q E Z W Z T -

1802 ----- 1861  
 cagtacactgggtccgacccccgacctggacgactgtatcacctacctgtctacctgggt

b V M

1862 ----- 1921  
 tttctaccaccaacttactaaagggtgagtccgggacccgggttctccttttttctccc

b

1922 ----- 1981  
 cttttttctttttttttctttttcttttttttttttttttttttttttttttttttttttt

b

1982 ----- 2011  
 ttttttttttttttttttttttttttttttttttttt

b

Enzymes that do cut:

SacI

16/30

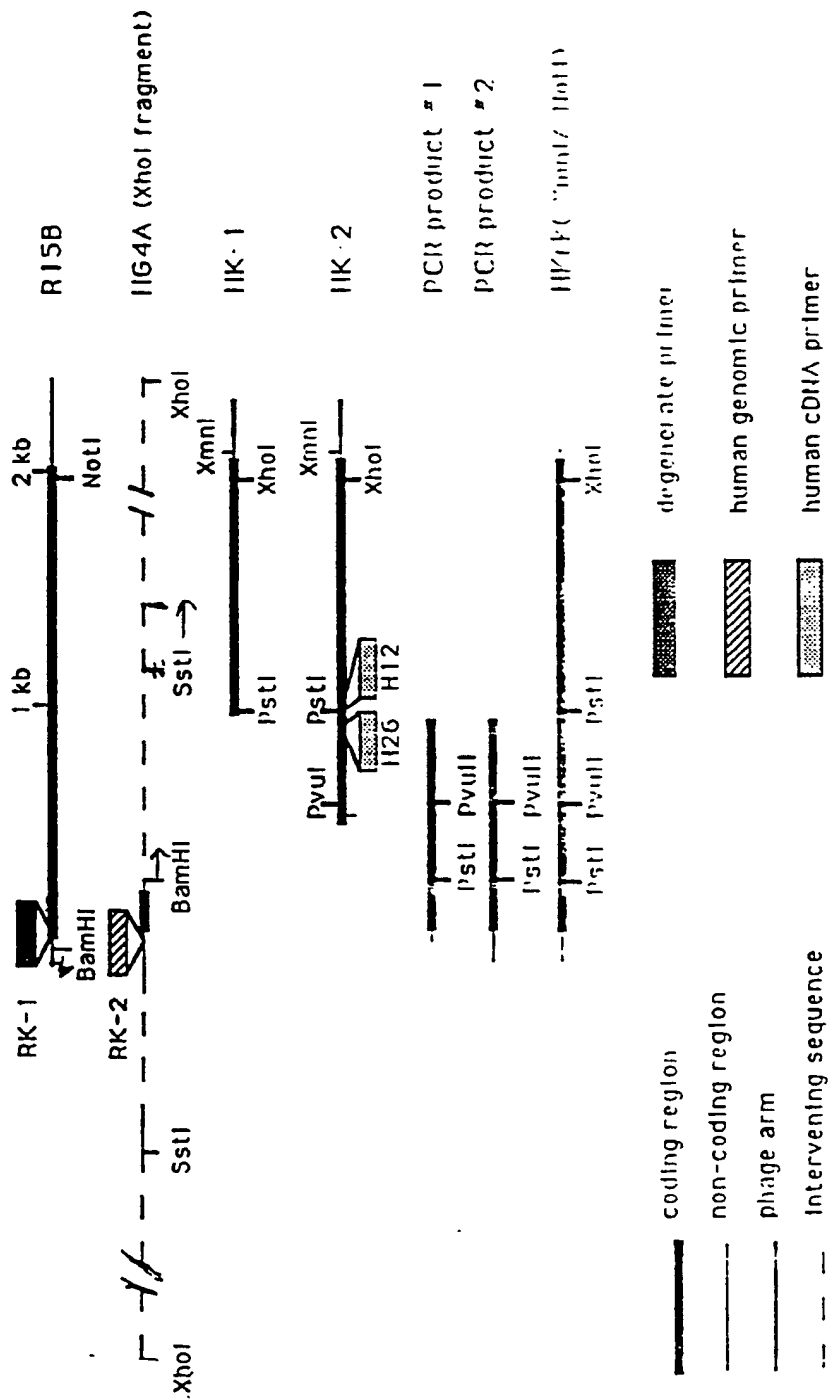


Fig. 7

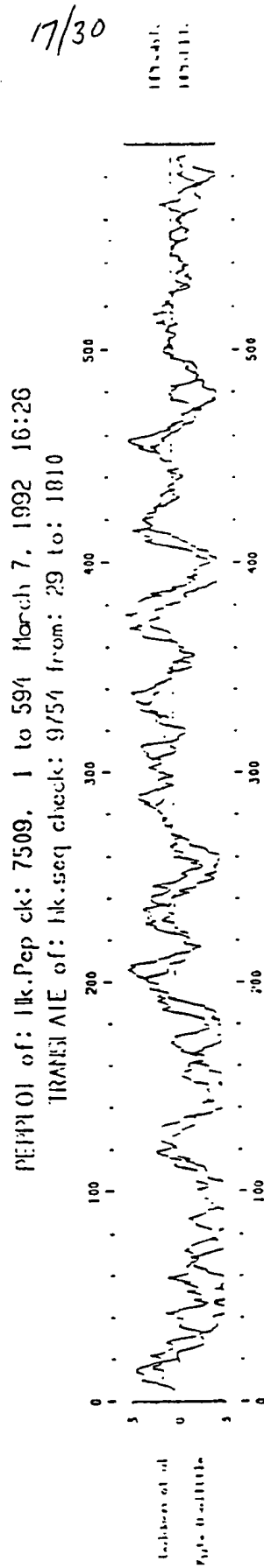
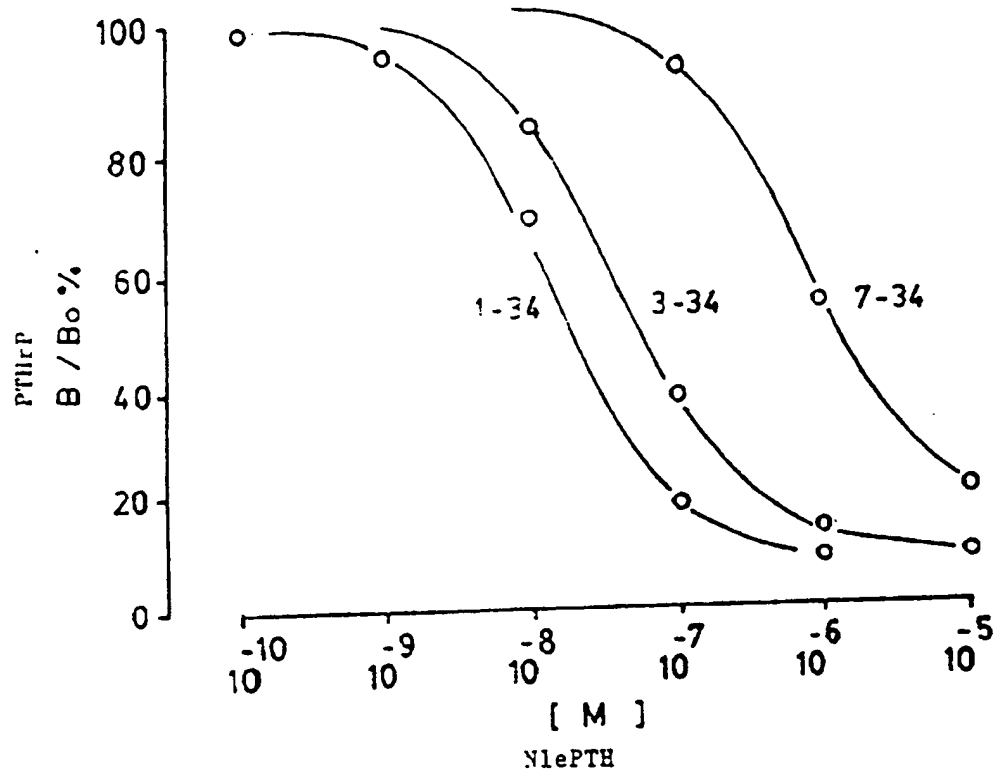


Fig.3

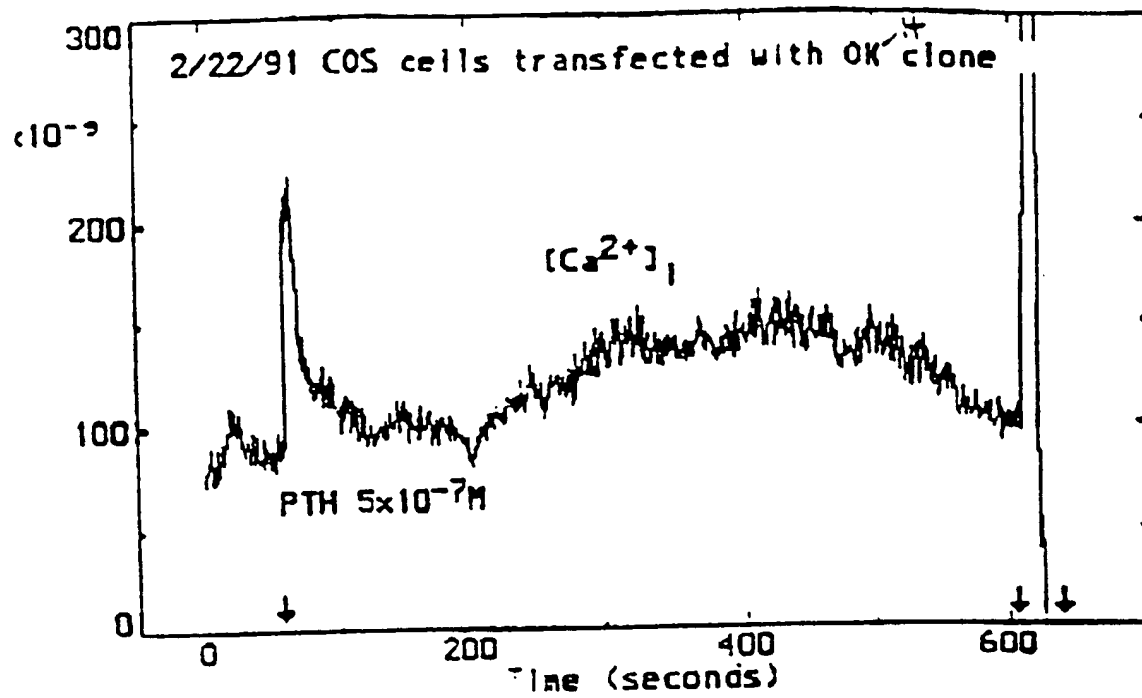
18/30

FIG. 9



19/30

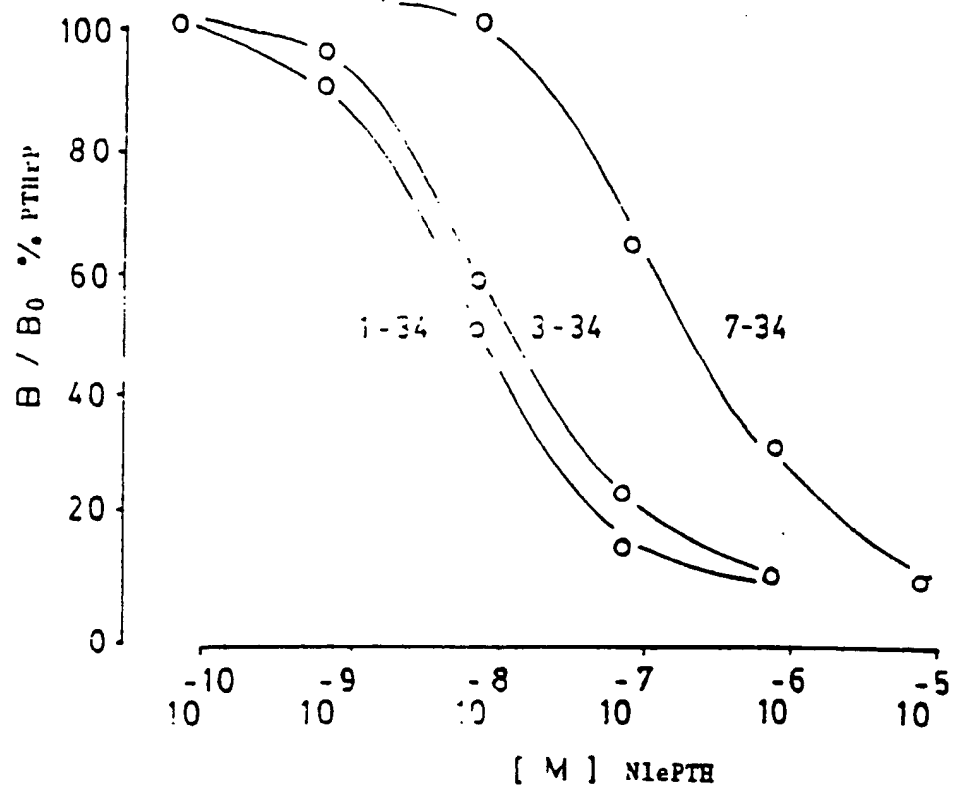
FIG. 10





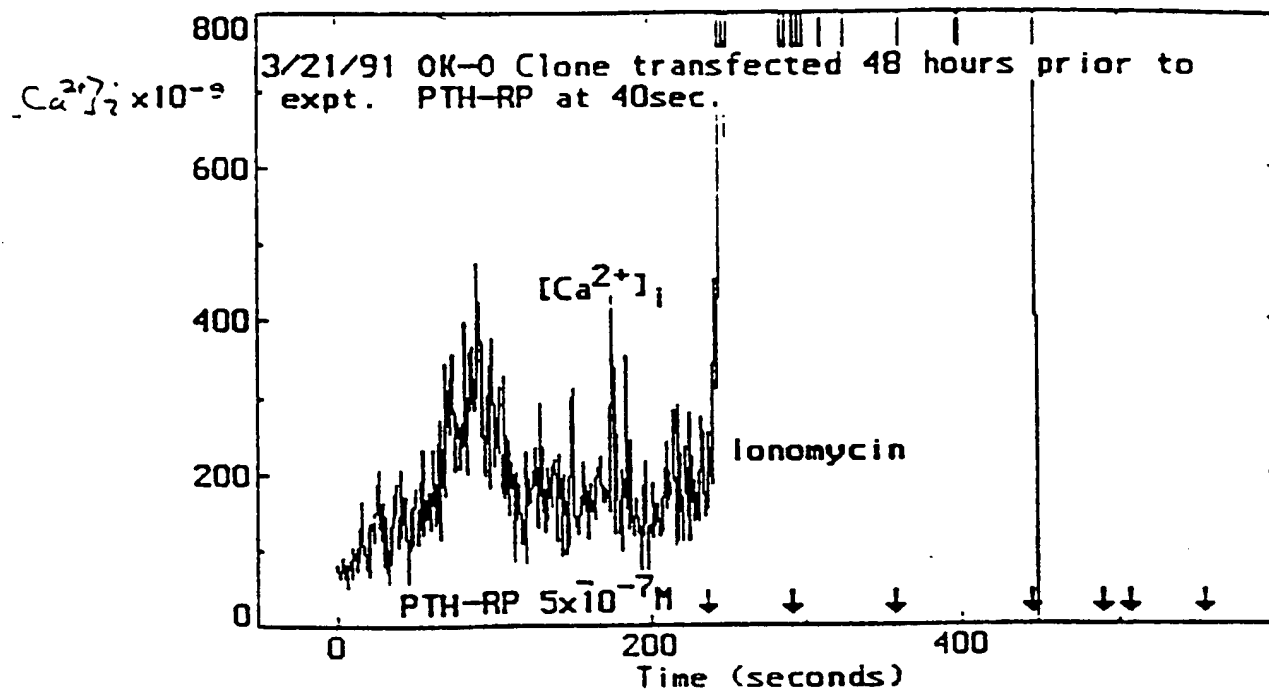
20/30

Fig. 11



21/30

FIG.12



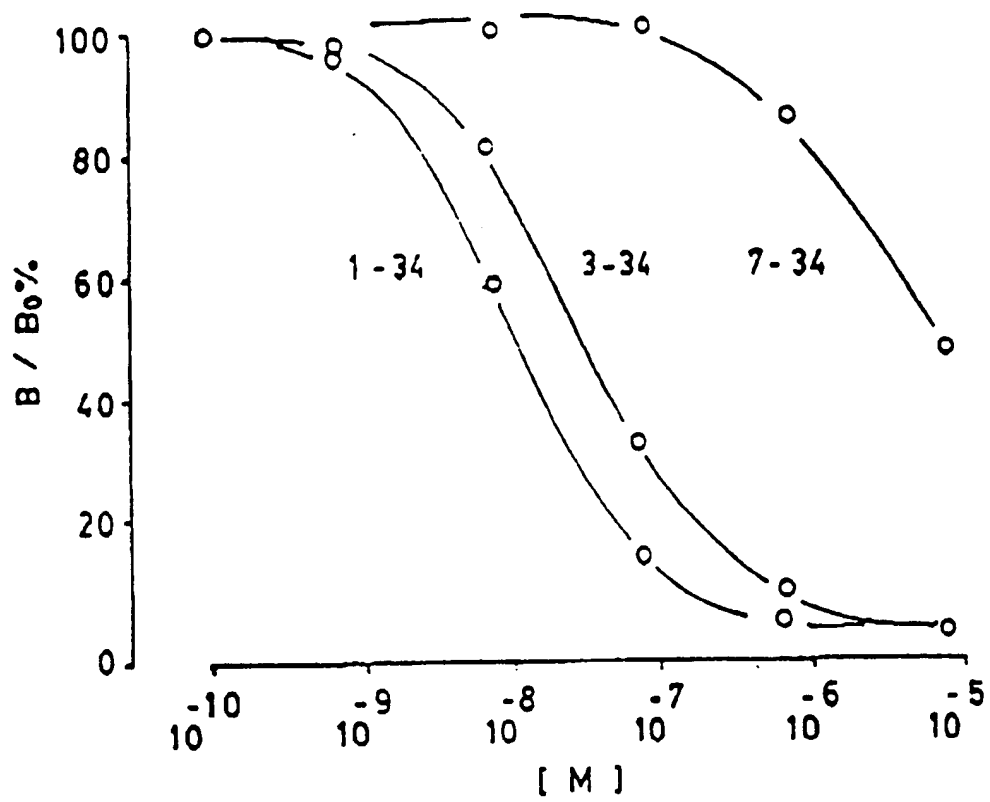
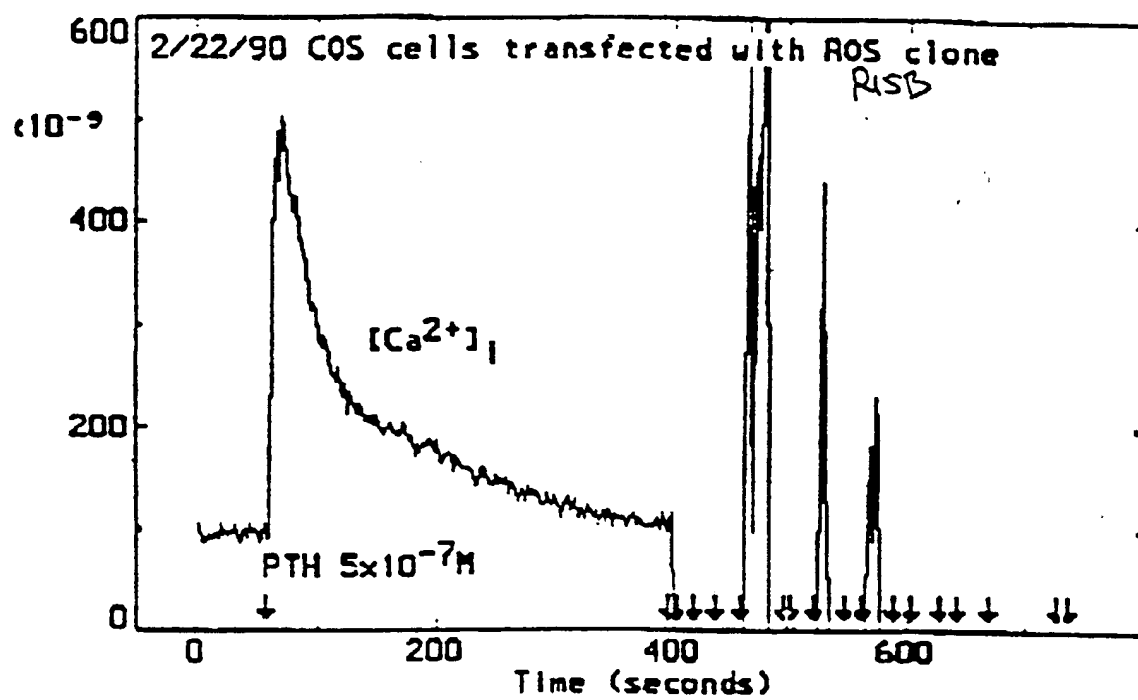


FIG. 13

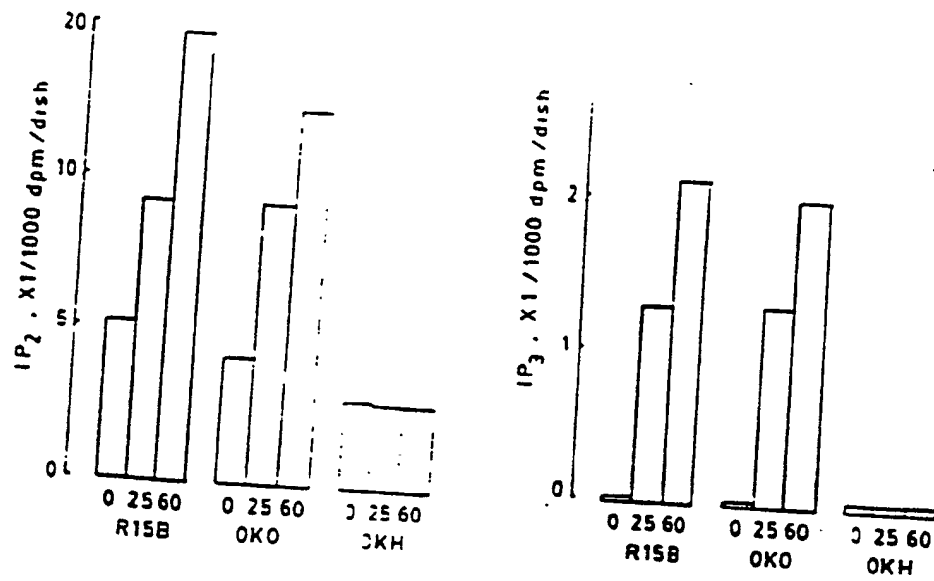
23/30

FIG. 14



24/30

FIG. 15



25/30

FIG. 16

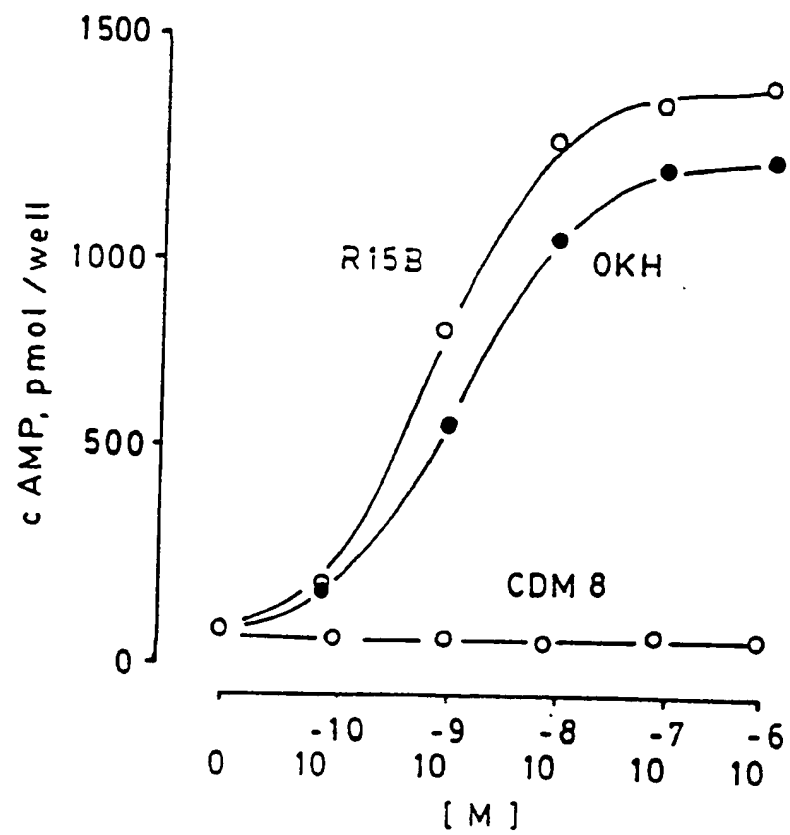


Fig. 17

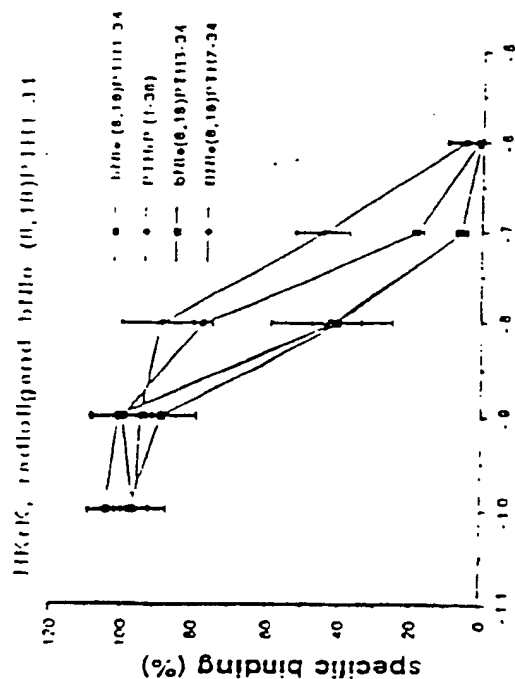
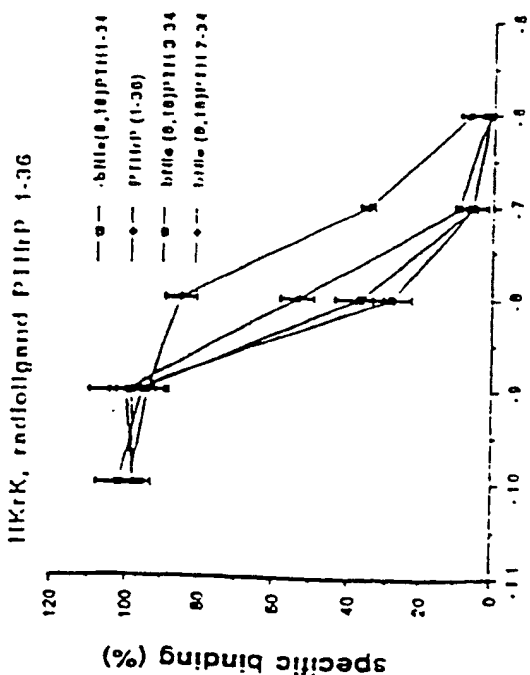
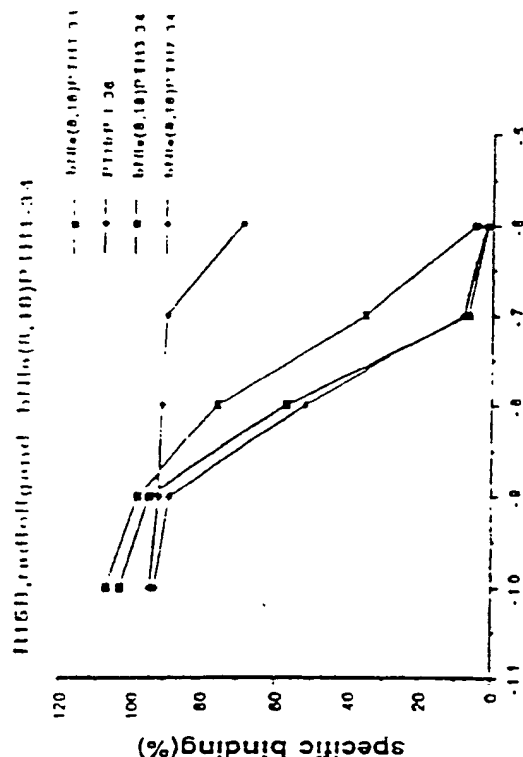
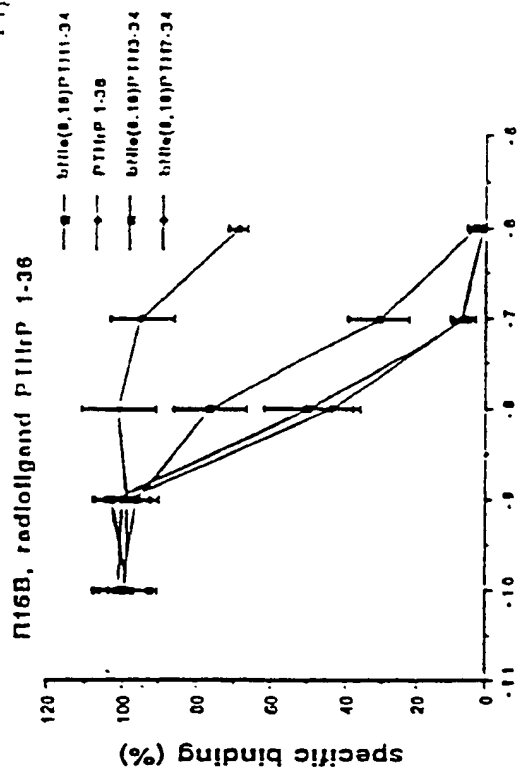
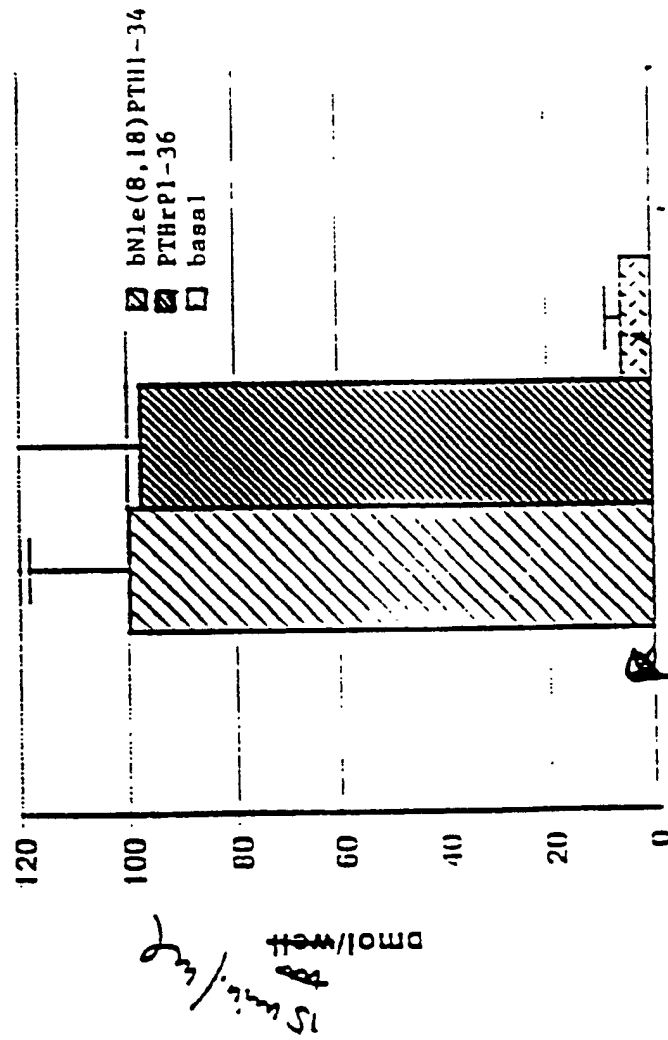


FIG. 18





28/30

Fig. 19

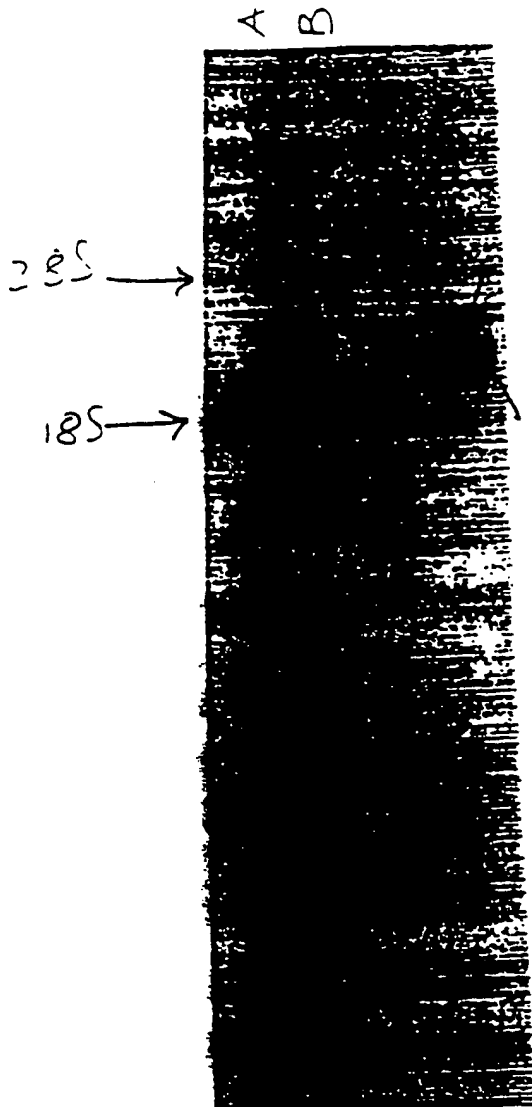
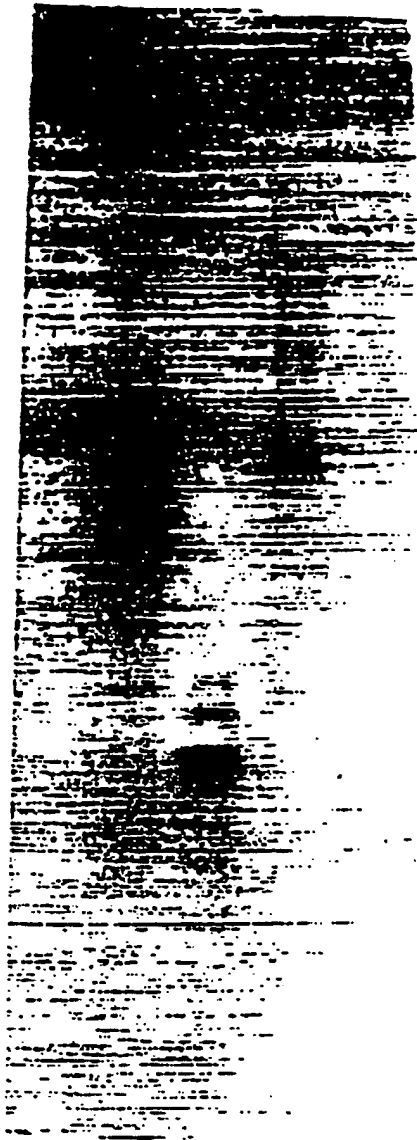


Fig. 20

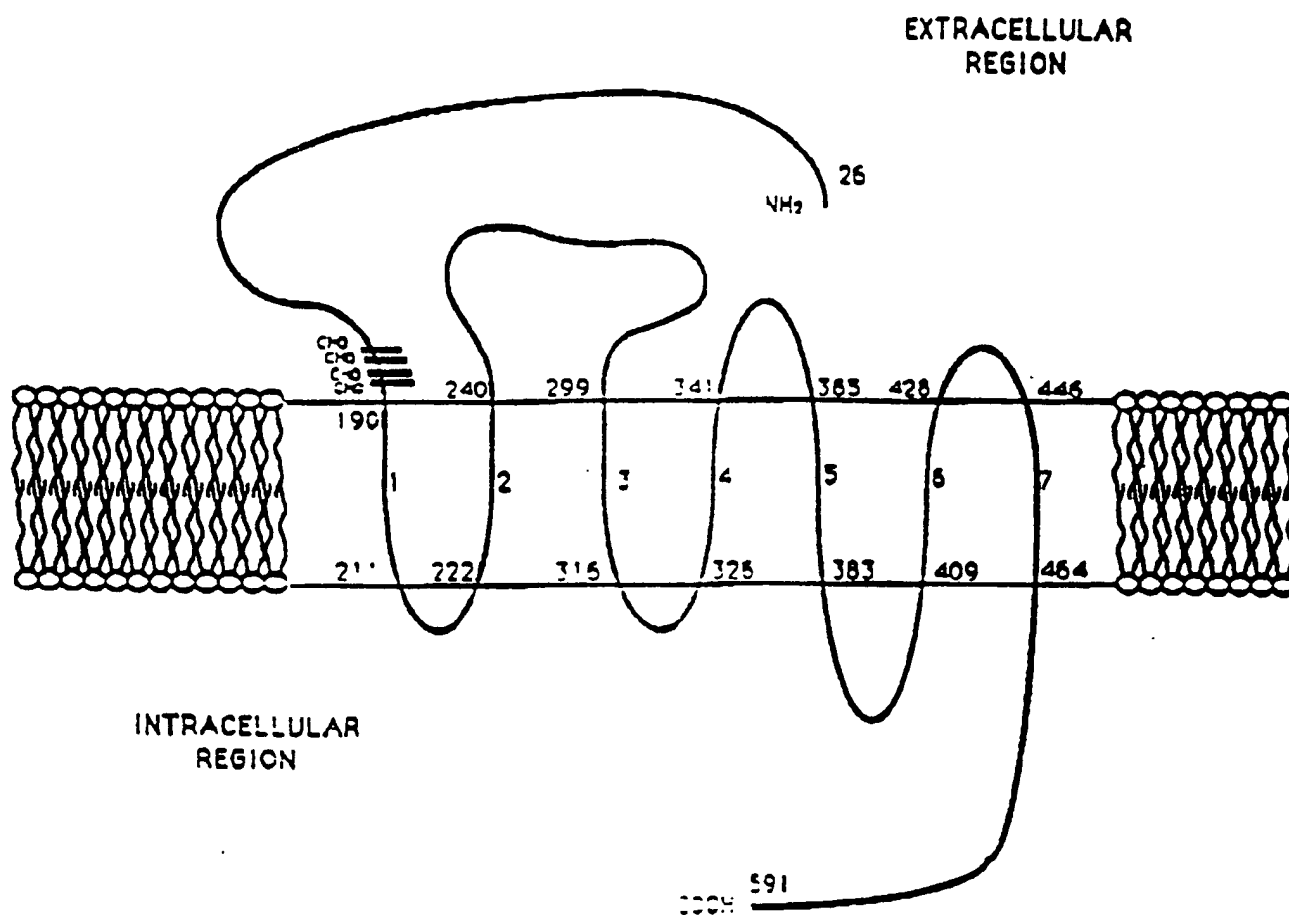


(1)

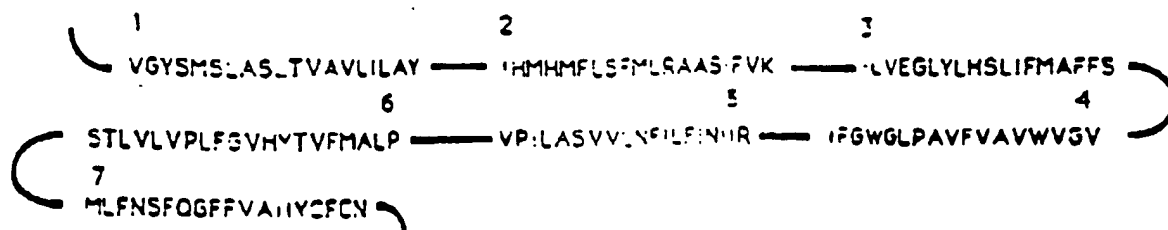
30/30

Fig. 21

# RAT BONE PTH/PTHrP RECEPTOR



## AMINO ACID SEQUENCE OF 7 PUTATIVE TRANS-MEMBRANE REGIONS



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US92/02821

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(5) : Please See Extra Sheet.

US CL : 435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29; 530/350, 387, 397, 399.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : APS AND COMMERCIAL DATABASES (DIALOG) 435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG AND ONLINE SEQUENCE SEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TWENTY-SEVENTH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, VOLUME 105, NO. 4, PT. 2, ISSUED OCTOBER 1987, R. A. LUBEN ET AL., "MOLECULAR CLONING OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED MEMBRANE PROTEIN FROM MOUSE BONE CELLS", ENTIRE DOCUMENT.	1-19, 39 20-38, 40-49
Y	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL 265, NO. 1, ISSUED 05 JANUARY 1990, ABOU-SAMRA ET AL., "CHARACTERIZATION OF FULLY ACTIVE BIOTINYLATED PARATHYROID HORMONE ANALOGS", PAGES 58-62, ENTIRE DOCUMENT.	1-49 -
Y	BIOCHEMISTRY, VOLUME 29, NO. 30, ISSUED 31 JULY 1990, JUPPNER ET AL., "PREPARATION AND CHARACTERIZATION (N-(4-AZIDO-2-NITROPHENYL)ALA, TYR-36)-PATHYROID HORMONE RELATED PEPTIDE (1-36) AMIDE: A HIGH-AFFINITY, PARTIAL AGONIST HAVING HIGH CROSS-LINKING EFFICIENCY WITH ITS RECEPTOR ON ROS 17/2.8 CELLS", PAGES 6941-6946, ENTIRE DOCUMENT.	1-49

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:		"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance		
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 JULY 1992

Date of mailing of the international search report

31 JUL 1992

Name and mailing address of the ISA/  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No.

Authorized officer

GIAN WANG

Telephone No. (703) 308-3993

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US92/02821

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (5):

C12P 21/06; C12N 5/00, 15/00; C07H 15/12, 17/00; C07K 3/00; A61K 35/14, 37/24, 37/36.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**